

HISTOPATHOLOGISCHE
UND IMMUNHISTOCHEMISCHE
UNTERSUCHUNGEN
ZUR FUSSOHLENREAKTION DER MAUS
NACH INFEKTION MIT SALMONELLA
CHOLERAЕ SUIС

Thomas Ewringmann

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554816_0076

Aus dem Institut für Tierpathologie
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. W. Hermanns
ehem. Vorstand: Prof. Dr. J. von Sandersleben

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. habil. A. Pospischil
Universität Zürich

HISTOPATHOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE
UNTERSUCHUNGEN ZUR FUSSOHLENREAKTION DER MAUS
NACH INFektion MIT SALMONELLA CHOLERAЕ SUIs

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Thomas Ewringmann
aus München

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse
Referent: Prof. Dr. J. von Sandersleben
Korreferent: Prof. Dr. H. Mahnel

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

Meinen Eltern
in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. LITERATURÜBERSICHT	3
1. Pathogenese von Salmonelleninfektionen	3
2. Schutzimpfung von Mäusen gegen Salmonellose	8
2.1. Impfung mit attenuierten oder avirulenten Salmonellenstämmen	8
2.2. Impfung mit antigen wirksamen Bakterienwandextrakten	10
3. Schutzimpfung von Schweinen gegen Salmonella cholerae suis	14
4. Untersuchungen zur Oberempfindlichkeitsreaktion als Parameter für eine Immunitätsentwicklung	15
5. Immunhistochemie	22
5.1. Grundlagen und Methoden	22
5.2. Anwendung	28
C. MATERIAL UND METHODEN	34
1. In- vivo- Versuche	34
1.1. Tiermaterial	34
1.2. Durchführung der in- vivo- Versuche	34
1.2.1. Versuch 86-3	34
1.2.2. Versuch 86-5	35
1.2.3. Versuch 86-8	35
2. Untersuchungsmaterial	36
3. Eigene Untersuchungen	39
3.1. Histopathologische Untersuchung	39
3.1.1. Semiquantitative Erfassung der entzündlichen Veränderungen	39
3.1.2. Charakterisierung der Entzündungsqualität	40
3.2. Immunhistochemie	40
3.2.1. ABC- Methode	41
3.2.2. PAP- Methode	43
3.2.3. Kontrollansätze	44
3.2.4. Immunhistochemische Befunderhebung	45

D. ERGEBNISSE	46
1. Ausmaß und Charakter der histologisch erfaßbaren entzündlichen Reaktion	46
1.1. Versuch 86-3: Fußsohlenreaktion nach Vorimmunisierung	46
1.2. Versuch 86-5/ I-V: Zeitverlauf der Fußsohlenreaktion nach S. ch. s. 33-13- Injektion	53
1.3. Versuch 86-5/ VI-X: Zeitverlauf der Fußsohlenreaktion nach S. ch. s. 38-9- Injektion	57
1.4. Versuch 86-8: Fußsohlenreaktion nach Injektion von OMP bzw. lebenden S. ch. s. mit und ohne Vorimmunisierung	60
2. Immunhistochemie	64
2.1. Nachweisbarkeit von Salmonellen und Salmonellenantigen mit immunhistochemischen Methoden	64
2.2. Vergleich der Eignung von ABC- und PAP- Methode für den Erregernachweis	64
2.3. Immunhistochemisch darstellbare Erregerlokalisation	65
3. Beziehung zwischen histopathologischem Befund, Fußsohlenschwellung und semiquantitativem, immunhistochemischem Erreger- Antigennachweis	67
3.1. Versuch 86-3	67
3.2. Versuch 86-5/ I-V	71
3.3. Versuch 86-5/ VI-X	74
3.4. Versuch 86-8	78
E. DISKUSSION	82
F. ZUSAMMENFASSUNG	98
SUMMARY	100
G. LITERATURVERZEICHNIS	102

A. EINLEITUNG

Die Salmonelleninfektionen haben bei Tier und Mensch in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Zu den Hauptinfektionsquellen des Menschen zählen Lebensmittel tierischen Ursprungs, daher ist die Bekämpfung von Salmonelleninfektionen beim Tier sowohl von tier- als auch von humanmedizinischem Interesse. Die prophylaktische Impfung stellt eine erfolgversprechende Bekämpfungsmaßnahme dar (Baljer 1984).

In vielen Teilen der Welt ist die Salmonellose eine der wirtschaftlich bedeutendsten septikämischen und enteralen Erkrankungen beim Schwein, wobei *Salmonella cholerae suis* in den USA bei Schweinen mit afrikanischer Salmonellose der am häufigsten isolierte Serotyp ist (Reed et al., 1986). Auch in Europa, so in den EG- Staaten Großbritannien, Irland und Niederlanden, wird *S. cholerae suis* als Erreger der Schweinesalmonellose nachgewiesen (Rolle-Mayr, 1984). Aus der DDR liegen Mitteilungen über *S. cholerae suis*- Erkrankungen in Jungschweinebeständen vor, die mit einer Mortalitätsrate von mehr als 30% einhergingen (Schöll und Grünert, 1986).

Die Virulenzeigenschaften bestimmter *S. cholerae suis*- Stämme bei der Maus sind auf das Schwein übertragbar (Griffith und Kramer, 1983). Mit Hilfe von Impfversuchen an Mäusen sollen Einblicke in die Immunisierungsmöglichkeiten beim Schwein gewonnen werden. Hautreaktionen im Sinne einer spät reagierenden, zellulären Überempfindlichkeit nach Infektion von Erregern bzw. Erregerantigen können als Parameter einer bestehenden protektiven Immunität angesehen werden (Mayr et al., 1984).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, anhand der Fußsohlenreaktion bei Mäusen mit Hilfe einer histo-

pathologischen Untersuchung die folgenden Fragestellungen zu bearbeiten:

- Inwieweit ist eine Beeinflussung der Fußschlenreaktion durch eine Vorimmunisierung nachweisbar?
- Besteht eine Abhängigkeit der Reaktionsstärke von der Immunisierungsdosis?
- Wie stellt sich die Fußschlenreaktion in unterschiedlichen Zeitabständen nach Injektion morphologisch dar?
- Sind hierbei Unterschiede nach Injektion avirulenter oder virulenter *S. cholerae suis*- Stämme feststellbar?
- Ist eine Fußschlenreaktion durch Injektion des Bakterienwandextraktes OMP virulenter *S. cholerae suis*- Erreger auslösbar?
- Ergeben sich Unterschiede in Art und Ausmaß der Fußschlenreaktion nach Injektion von OMP bzw. lebenden virulenten *S. cholerae suis*- Erregern?
- Welches morphologische Äquivalent entspricht der Fußschlenschwellung?

Darüber hinaus sollen *S. cholerae suis*- Erreger bzw.

- Erregerantigen mit Hilfe verschiedener immunhistochemischer Methoden in Formol- fixiertem und in Paraffin eingebettetem Fußschlengewebe nachgewiesen werden.

B. LITERATURÜBERSICHT

1. Pathogenese von Salmonelleninfektionen

Bei einer Infektion mit Salmonellen werden sowohl zelluläre als auch humorale Abwehrreaktionen des Wirtsorganismus ausgelöst. Den beiden Komponenten kommt jedoch unterschiedliche Bedeutung im Rahmen der Infektabwehr zu (Desiderio und Campbell, 1985). Übereinstimmend wird in der Literatur die dominierende Rolle zellulärer Reaktionsmechanismen unter besonderer Berücksichtigung des MPS (Mononukleäres Phagozytensystem) hervorgehoben (Collins et al., 1966; Baskerville et al., 1972; van Furth et al., 1972; Collins, 1974; Marecki et al., 1975; Galdiero et al., 1978).

Voneinander abweichende Mitteilungen finden sich hinsichtlich der Art der Beteiligung von mononukleären Phagozyten im Verlauf des Infektgeschehens. Bei der Maus unterstreichen Marecki et al. (1975) die zentrale Rolle der bakteriziden Kapazität der Makrophagen für die Eliminierung der Erreger. Nach Meinung der Autoren beruht die Pathogenität virulenter Salmonellen vor allem auf ihrer Resistenz gegen Phagozytose und ihrer Fähigkeit, sich extrazellulär im Wirtsgewebe zu vermehren.

Von Baskerville et al. (1972) liegen elektronenmikroskopische Untersuchungsbefunde zur Phagozytose von virulenten *Salmonella cholerae suis*-Keimen in der Lunge intranasal infizierter Schweine vor. Sämtliche Bakterien werden innerhalb eines kurzen Zeitraumes post infectionem in den distalen Luftwegen und Alveoli von Makrophagen und polymorphkernigen Granulozyten phagozytiert. Ein Großteil der Bakterien wird zerstört, einige überlebende Keime be-

ginnen sich zu vermehren. Zwischen dem 5. und dem 7. Tag nach der Infektion bewirken die Salmonellen nach Aussage der Autoren eine Nekrose von Phagozyten und werden somit freigesetzt.

Ein Vergleich der Aussagen von Baskerville et al. (1972) und Marecki et al. (1975) ergibt folgendes Bild: Beim Schwein werden nach einer Salmonelleninfektion die Mehrzahl der Bakterien von Makrophagen und neutrophile Granulozyten phagozytiert. Nach anfänglicher Zerstörung in den Phagozyten beginnen die Keime, sich intrazellulär zu vermehren (Baskerville et al., 1972). Bei der Maus vermehrt sich die Mehrzahl virulenter Salmonellen zuerst extrazellulär. Anschließend werden die Keime von den Phagozyten aufgenommen (Marecki et al., 1975). Die Aktivität von Makrophagen wird den Autoren zufolge, in Übereinstimmung mit Wells und Hsu (1970), verstärkt durch ihre "Bewaffnung" mit zytophilen Antikörpern sowie durch Opsonine und Agglutinine des Immunseryums.

Für die Maus virulente und avirulente *Salmonella typhimurium*-Stämme werden nach einer Infektion von Meerschweinchen in deren Makrophagen initial in unterschiedlichem Maße zerstört. Ca. 1% überlebende avirulente Bakterien beginnen nach 4 Stunden mit ihrer Vermehrung, ca. 8% des virulenten Stammes schon nach 3 Stunden. Diese intrazelluläre Vermehrung erfolgt bei beiden Stämmen in vergleichbarer Rate (Hsu und Radcliffe, 1968).

Makrophagen nicht immunisierter Tieren können fakultativ intrazelluläre Keime, so auch Salmonellen, nicht zerstören. Dagegen sind Makrophagen von infizierten Tieren dazu in der Lage (Tizard, 1981). Diese sogenannten "aktivierten" Makrophagen sind vergrößert, haben verstärkte Stoffwechselaktivitäten

und bakterizide Eigenschaften. Bei der Aktivierung handelt es sich um eine Form der zellvermittelten Immunität. Die Aktivierung wird durch Lymphokine vermittelt, die von sensibilisierten T- Zellen bei Kontakt mit Bakterienantigen freigesetzt werden (Tizard, 1981; Attridge und Kotlarski, 1985).

Einen weiteren Aspekt stellt die Kooperation verschiedener Lymphozytenpopulationen dar. Nach Gal-diero et al. (1978) beruht schon der Verlauf einer Primärinfektion maßgeblich auf dem Verhalten von T- und B- Lymphozyten. Die erfolgreiche Bekämpfung der Infektion setzt eine komplexe Antwort beider Lymphozytentypen in allen lymphatischen Geweben voraus. Die Autoren sprechen darüber hinaus Salmonellen-bindenden Oberflächenrezeptoren auf B-Lymphozyten immunisierter Mäuse besondere Bedeutung zu.

Nach Mayr et al. (1984) tritt die humorale Immunität bei einer Salmonellose spät ein, ist schwach ausgebildet und hält nur kurz an. Sie hat damit geringen Stellenwert. Desiderio und Campbell (1985) zufolge haben zirkulierende Antikörper die Aufgabe, anti-toxisch gegen Salmonellenendotoxine zu wirken und eine Bakteriämie zu verhindern.

Die immunologische Situation bei Salmonelleninfektionen wird zum einen durch die Abwehrmechanismen des Wirtes, zum anderen durch den Aufbau der bakteriellen Erreger beeinflusst.

Die unterschiedliche Fähigkeit verschiedener *Salmonella cholerae suis*- Stämme, einer Phagozytose und Abtötung zu widerstehen, ist bedingt durch unterschiedliche Zusammensetzung und Struktur der Bakterienzellwand (Griffith und Kramer, 1983).

Die Zellwand gramnegativer Bakterien enthält große Mengen Proteine, Lipoproteine, Lipopolysaccharide und Phospholipide. Der Aufbau der Liposaccharid-Proteinkomplexe verschiedener Vertreter gram-negativer Bakterien erklärt das voneinander abweichende antigene Verhalten dieser Bakterien (Rolle- Mayr, 1984).

Der Wildtyp (glatte Form, "smooth form (s)") und Zellwandmutanten (rauhe Form, "rough form (r)") von *Salmonella typhimurium*- Stämmen verhalten sich unterschiedlich bezüglich ihrer Empfindlichkeit für Aufnahme und Destruktion durch Mäuseperitonealmakrophagen (Friedberg und Shilo, 1970). Die Autoren stellen die Bedeutung eines kompletten Lipopolysaccharid- (LPS-)kernes der Bakterienzellwand heraus. Die r- Formen mit inkomplettem LPS- Kern werden wesentlich schneller phagozytiert und abgetötet als die s- Formen mit komplettem LPS- Kern.

Valtonen (1977) sieht in der Phagozytose einen wichtigen Parameter zur Bestimmung der Virulenz gering unterschiedlicher s- *Salmonella typhimurium*- Stämme an.

Auch gegenüber Serumkomplement und spezifischen Antikörpern existiert eine geringere Empfindlichkeit von glatten Salmonellen, bedingt durch ihre dickere LPS- Hülle, im Vergleich zu rauhen Stämmen (Reynolds und Pruul, 1971).

Phagozytose und Tötung von *Salmonella cholerae suis*- Keimen durch neutrophile Granulozyten vom Schwein spielen in den frühen Stadien der Infektion eine wichtige Rolle für den Ausgang des Krankheitsprozesses (Griffith und Kramer, 1983). Bei einer Untersuchung bestimmter *Salmonella cholerae suis*- Stämme auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Antikörper und Komplement beim Schwein unterscheiden Griffith

und Kramer (1982) empfindliche und resistente Stämme. In ihrer Folgearbeit (Griffith und Kramer, 1983) bestimmen sie die Sensitivität dieser Stämme für Phagozytose und Tötung durch neutrophile Granulozyten des Schweines. Nach Aussage der Autoren besteht eine positive Korrelation zwischen der Empfindlichkeit gegenüber komplementbindenden Antikörpern und der Empfindlichkeit für Phagozytose und Tötung durch neutrophile Granulozyten.

Griffith et al. (1984) legen Ergebnisse einer Untersuchung über die Virulenz bestimmter Antikörper- und Komplement- empfindlicher und -resistenter *Salmonella cholerae suis*- Stämme für Schwein und Maus vor. Die Virulenz bestimmter *Salmonella cholerae suis*- Stämme für das Schwein ist aufgrund ihrer Virulenz für die Maus, im Sinne eines Tiermodells, vorhersagbar. Nach Mitteilung der Autoren ist ein Teil der Stämme, wie z.B. Stamm 33, avirulent und empfindlich gegenüber Antikörper- Komplement und Phagozytose durch neutrophile Granulozyten. Hingegen ist Stamm 38 empfindlich gegenüber Antikörper- Komplement und Phagozytose durch neutrophile Granulozyten, aber hochvirulent. Trotzdem kann vom Verhalten beider Stämme bei der Maus auf ihr Verhalten beim Schwein geschlossen werden.

Die Immunisierung von Schweinen mit dem avirulenten Stamm 33 erzeugt nach Griffith et al. (1984) eine partielle Immunität der Tiere gegen eine im Abstand von 21 Tagen vorgenommene Infektion mit dem virulenten Stamm 38.

2. Schutzimpfung von Mäusen gegen Salmonellose

2.1. Impfung mit attenuierten oder avirulenten Salmonellenstämmen

Der Impfprophylaxe von fakultativ intrazellulären Keimen sind verschiedene Merkmale gemeinsam: Totimpfstoffe versagen, es entsteht kein passiver Schutz durch Serumübertragung und keine Beziehung zwischen Antikörpertiter und Infektionsschutz (Tizard, 1981). Bei der Impfung gegen fakultativ intrazelluläre Bakterien stehen Lebendvaccinen aus attenuierten oder avirulenten Bakterien im Vordergrund (Tizard, 1981; Mayr et al., 1984). Das in vivo-Wachstum verschiedener attenuierter und avirulenter Salmonellenstämmen ist von besonderer Bedeutung. Stämme, die nicht im Gewebe persistieren und sich in der Folge nicht vermehren können, erzeugen keine bzw. nur eine sehr geringe zellvermittelte Immunität (Blanden et al., 1966; Collins et al., 1966; Hormaeche et al., 1981; Udhayakumar und Muthukkaruppan, 1983).

Eine Totvaccine aus einem virulenten *Salmonella enteritidis*-Stamm bewirkt nur eine geringe Verlängerung der Überlebenszeit von Mäusen nach Infektion mit dem homologen virulenten Stamm (Collins et al., 1966). Entsprechende Ergebnisse liegen auch für *Salmonella typhimurium* vor (Cho et al., 1983).

Die Anwendbarkeit einer Lebendvaccine aus attenuierten Salmonellen setzt neben dem Verlust der Virulenz die völlige Unfähigkeit des attenuierten Stammes, durch eine Rückmutation die Virulenz wiederzuerlangen, voraus. Gleichzeitig kommt es auf den Erhalt sämtlicher, für die Ausbildung des Immunschutzes wichtigen Oberflächenantigene an (Stocker et al., 1983).

Die Impfung von Mäusen mit attenuierten *Salmonella typhimurium*- Stämmen erzeugt eine starke Makrophagenaktivierung und verleiht dem Tier damit eine länger anhaltende zellvermittelte Immunität (Nair und Kamat, 1982; Kita et al., 1986; Brown et al., 1987).

Nach Eisenstein et al. (1984) bewirkt die Makrophagenaktivierung infolge einer Injektion eines avirulenten *Salmonella typhimurium*- Stammes nicht nur eine Immunität gegen den homologen virulenten Stamm, sondern auch gegen eine Infektion mit *Listeria monocytogenes*. Es wird eine Kreuzimmunität gebildet.

Bezüglich des experimentellen Impfmodus bei der Maus existieren weitgehend übereinstimmende Mitteilungen. Die intraperitoneale Impfung mit einer Vaccine aus attenuierten *Salmonella enteritidis*- Stämmen zeigt die beste Wirksamkeit (Kenny und Herzberg, 1968; George et al., 1987).

Nach subkutaner Applikation sind nahezu gleichwertige Ergebnisse zu erzielen (Kenny und Herzberg, 1968). Danach folgt in der Wirksamkeit die orale Applikation an zweiter Stelle (George et al., 1987). Dies gilt auch für *Salmonella typhimurium* (Stocker et al., 1983).

Eine gute Immunität läßt sich nach Collins et al. (1966) auch mittels einer i.v.- Impfung von Mäusen mit einer Vaccine aus attenuierten *Salmonella gallinarum*- Bakterien erzielen.

Das optimale Dosisspektrum liegt bei einer intraperitoneal applizierten Vaccine aus einem attenuierten *Salmonella typhimurium*- Stamm zwischen 10^4 und 10^6 Erregern (Killar und Eisenstein, 1985). Die subkutane Impfung erfolgt bei Kenny und Herzberg (1968) mit 10^5 attenuierten *Salmonella enteritidis*- Keimen.

Nakoneczna und Hsu (1980) vergleichen die histopathologischen Veränderungen bei mit einem avirulenten *Salmonella typhimurium*- Stamm geimpften und ungeimpften Mäusen nach Infektion mit virulenten *Salmonella typhimurium*. Die ungeimpften Mäuse zeigen ab dem 4. Tag post infectionem histologisch multiple akute zellig- entzündliche Herde in Leber und Milz mit Vorherrschen von neutrophilen Granulozyten. Ab dem 7. Tag entwickeln sich die Läsionen graduell zu Granulomen mit zentraler Nekrose und peripher mononukleärer Zellpopulation. Der Ersatz der neutrophilen Granulozyten durch mononukleäre Zellen ist nach Meinung der o.g. Autoren Ausdruck verspäteter zellvermittelter Immunität. Die Tiere sterben trotzdem nach 8-12 Tagen an den Folgen einer massiven systemischen Infektion. Dagegen zeigen die geimpften Mäuse ab dem 3. Tag post infectionem nur histologisch nachweisbare, nahezu rein histiozytäre Mikrogranulome in Leber und Milz. Diese Veränderungen bleiben geringgradig und isoliert, ohne zentrale Nekrose. Ab der zweiten Woche nach Infektion erfolgt eine Regression der Läsionen und vollständige Rückbildung als Ausdruck erfolgreicher zellvermittelter Immunität. Nach Aussage der Autoren induziert die Vaccine aus avirulenten Erregern auch eine Antikörper- vermittelte Immunität.

2.2. Impfung mit antigen wirksamen Bakterienwand-extrakten

Die unterschiedlichen Ergebnisse bei den Impfversuchen mit Totvaccinen (Eisenstein und Sultzter, 1982) basieren zum Teil auf der unterschiedlichen, genetisch determinierten, Empfänglichkeit bestimmter

Mäusestämme für eine Salmonelleninfektion.

Die Impfung von Mäusen mit in Liposomen (von einer Elementarmembran umgebene, tropfenförmige Lipideinlagerungen im Zytoplasma der Zelle) inkorporiertem LPS von *Salmonella typhimurium* schützt die Tiere ebenso wie eine Lebendvaccine. Es wird eine zelluläre Immunität induziert (Desiderio und Campbell, 1985).

Nach Aussage von Plant et al. (1982) erzeugt ein durch Extraktion von Bakterienkulturen mit Trichlor-essigsäure gewonnener LPS- Protein- Komplex eine gute zellvermittelte Immunität in Mäusen. Die anfängliche Verzögerung der Bakterienmultiplikation nach Infektion mit lebenden Salmonellen wird allerdings auf eine unmittelbar wirkende humorale Komponente der Immunität zurückgeführt. Den Autoren zufolge ist ein minimaler Anteil sowohl an Zellwandprotein als auch an LPS im Komplex notwendig, um eine gute Immunität zu induzieren. Ein LPS- Extrakt der Außenmembran von *Salmonella typhimurium*- Keimen, gekoppelt an bovines Serumalbumin, erzeugt bei Mäusen keine Immunität gegen eine Infektion mit lebenden Erregern (Plant et al., 1978). Sowohl LPS als auch der Proteinanteil des Komplexes müssen Salmonellen- spezifisch sein, um einen Infektionsschutz zu bewirken (Plant et al., 1982). Auch Svenson und Lindberg (1981) koppeln antigen wirksames Oligosaccharid der Außenmembran von *Salmonella typhimurium*- Keimen an bovines Serumalbumin und lösen eine humorale Antikörperantwort in Mäusen und Kaninchen aus. Nach Ansicht der Autoren trägt die humorale Immunität zu einer effektiven Abwehr einer experimentellen Mäusesalmonellose bei.

Mit einem als Endotoxin- Protein bezeichneten Bakterienwandextrakt erzeugen Eisenstein und Sultzter (1982) bei Mäusen eine gute Immunität gegen eine Salmonelleninfektion. Das Endotoxin- Protein hat eine geringere Toxizität als gereinigtes LPS.

Zahlreiche Autoren untersuchen insbesondere die immunogenen Eigenschaften von Proteinextrakten der Bakterienaußenmembran (engl. Outer Membrane Protein = OMP) (Kuusi et al., 1979; Svenson et al., 1979; Kuusi et al., 1981; Udhayakumar und Muthukkaruppan, 1987a).

Einige der sog. OMP- Extrakte der Bakterienwand bilden Diffusionsporen und werden im englischen Sprachraum als "porin" bezeichnet (Kuusi et al., 1979). Diese "porine" liegen in der Bakterienaußenmembran als Trimere in enger Verbindung mit LPS vor und werden in Form dieser Verbindung oder hochgereinigt, also LPS- frei, als Impfstoff verwandt (Kuusi et al., 1981).

Eine Impfung von Mäusen mit einem Konjugat aus Octasaccharid und hochgereinigtem OMP der Außenmembran von *Salmonella typhimurium* erzeugt eine bessere Immunität gegen eine Infektion mit einem virulenten *Salmonella typhimurium*- Stamm als die Immunisierung mit OMP oder dem Octasaccharid alleine (Svenson et al., 1979). Die aktive Immunisierung mit mehr als einer Oberflächenkomponente der Bakterienaußenmembran verbessert somit die Effizienz der Vaccine. Durch Verwendung einer ungereinigten OMP- Präparation eines rauhen (r-) *Salmonella typhimurium*- Stammes lassen sich Mäuse sowohl durch aktive als auch passive Immunisierung vor Infektion mit einem glatten (s-) *Salmonella typhimurium*- Stamm schützen (Kuusi et al., 1979 u. 1981). Die Entfernung der LPS- Komponente wird begleitet von einem Verlust der

protektiven Kapazität bei passiver Immunisierung. Erneute Kopplung von hochgereinigtem "porin" an LPS macht diesen Verlust rückgängig. Die Bildung protektiver Antikörper läßt sich also auf die Wirkung von LPS zurückführen. Die antigene Wirksamkeit von "porin", in Form der Auslösung einer zellulären Immunität, wird durch die Reinigung der Präparation nicht vermindert (Kuusi et al., 1981).

Vergleichbare Ergebnisse bei einer Impfung von Mäusen mit OMP von rauhen (r-) und glatten (s-) *Salmonella typhimurium*- Stämmen erhalten Udhayakumar und Muthukkaruppan (1987a). Der induzierte Schutz hält mindestens 6 Monate an. Nach Aussage der Autoren bewirkt OMP eine verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion, die 2 Wochen nach Impfung mit OMP auftritt und mindestens bis zur 4. Woche persistiert.

Die histopathologische Untersuchung der Leber und der Milz von Mäusen nach einer Infektion mit virulenten *Salmonella typhimurium* zeigt sowohl bei den ungeimpften Kontrollmäusen als auch bei den mit Zellwandfragmenten von *Salmonella typhimurium* geimpften Tieren Abszesse in verschiedenen Entwicklungsstadien (Hsu et al., 1985). Im Gegensatz zu den Veränderungen bei den Kontrollmäusen sind die Läsionen in den Organen der vaccinierten Tiere jedoch geringgradiger. Eine Woche nach Infektion beginnt die Transformation der Läsionen in Granulome; neutrophile Granulozyten werden durch mononukleäre Zellen ersetzt. Nach ca. 3 Wochen ist den o.g. Autoren zufolge eine beginnende Regeneration der Organe nachweisbar.

3. Schutzimpfung von Schweinen gegen *Salmonella cholerae suis*

Kramer et al. (1987) immunisieren Absatzferkel entweder konjunktival oder intramuskulär mit dem avirulenten lebenden *Salmonella cholerae suis*-Stamm 33-13. Nach 28 Tagen werden die Tiere intratracheal mit dem virulenten Stamm 38-9 infiziert. Die nichtgeimpften Kontrollschweine entwickeln persistierendes hohes Fieber, Bakteriämie und Diarrhoe mit Ausscheidung von Stamm 38-9. Die geimpften Schweine bleiben afebril und klinisch unauffällig. Den o.g. Autoren zufolge wird Stamm 33-13 nicht und Stamm 38-9 nur in geringem Maße in bakteriologisch untersuchten Organen der geimpften Schweine nachgewiesen. Die intramuskuläre Impfung verursacht postvaccinal vorübergehend hohes Fieber und Ausscheidung von Stamm 33-13 über die Faeces. Der konjunktivale Impfmodus bleibt ohne Nebenwirkungen.

Beide Stämme werden biochemisch und serologisch als *Salmonella cholerae suis* var. kunzendorf identifiziert.

Von Hanna et al. (1979) liegen Ergebnisse einer subkutanen Impfung von Absatzferkeln mit einem attenuierten, lebenden *Salmonella cholerae suis*-Stamm vor. Nach intranasaler Infektion mit einem *Salmonella cholerae suis*-Feldstamm wird die Schutzwirkung im Vergleich zu nichtgeimpften Tieren untersucht. Die nichtgeimpften Schweine sterben oder entwickeln chronische Lungenläsionen, während die geimpften Tiere keine klinische Erkrankung zeigen. Nach Meinung der Autoren verhindert die subkutane Vaccinierung der Schweine zwar Tod und klinische Erkrankung, kann aber die Invasion der Gewebe nach

intranasaler Infektion mit dem Erreger nicht abwenden.

Eine einmalige orale Immunisierung mit einem Impfstoff aus einem attenuierten Lebend- *Salmonella cholerae suis*- Stamm führt nach Schöll und Grünert (1979) zu 95,5% überlebenden Ferkeln nach einer 21 Tage später vorgenommenen oralen Belastung mit Lebendkeimen eines virulenten *Salmonella cholerae suis*- Stammes. Beim Saugferkel ist ein Schutzeffekt schon 3 Tage nach oraler Immunisierung nachweisbar. Versuche der gleichen Autoren, Schweine oral mit einem inaktivierten Antigen zu immunisieren, verliefen unbefriedigend.

4. Untersuchungen zur Überempfindlichkeitsreaktion als Parameter für eine Immunitätsentwicklung

Bei der im Rahmen von Immunvorgängen erworbenen, auch als Allergie bezeichneten, spezifischen Überempfindlichkeit des Organismus kommt es bei einem Erstkontakt des Körpers mit dem Allergen, z.B. einem Bakterienantigen, zur Bildung von Antikörpern oder Aktivierung von Immunzellen. Ein zweiter Antigenkontakt führt zur Entwicklung einer Überempfindlichkeitsreaktion.

Man unterscheidet den Typ der sofortreagierenden, humoralen Überempfindlichkeit (immediate type hypersensitivity = ITH) mit Antikörperbeteiligung und den Typ der spätreagierenden, zellulären Überempfindlichkeit (delayed type hypersensitivity = DTH) mit Immunzellbeteiligung (Tizard, 1981; Male, 1986).

Die ITH wird in drei Typen unterteilt, wobei hier

nur kurz auf den Typ III, die Immunkomplex- vermittelte Überempfindlichkeit in Form der lokalen, sog. Arthus- Reaktion, eingegangen werden soll. Bei einer Ablagerung von komplementbindenden Immunkomplexen lokal im Gewebe kommt es nach subkutaner Antigeninjektion im Minuten- bis Stundenabstand zu einer akuten Entzündung mit ödematöser Schwellung. Das histologische Bild zeigt eine Vaskulitis und Perivaskulitis. Schließlich kommt es zum Austreten neutrophiler Granulozyten aus den Gefäßen. Erreicht die Reaktion nach 6 - 8 Stunden ihren Höhepunkt, sieht man eine dichte Infiltration der Reaktionsstelle mit polymorphkernigen Leukozyten, welche die Immunkomplexe phagozytieren. Infolge Freiwerdens lysosomaler Enzyme stellt sich eine leukozytär-nekrotisierende Entzündung mit Thrombosierung und Zerstörung von Gefäßen und weiterer Ödematisierung des Gewebes ein. Ca. 8 Stunden nach Beginn der Reaktion treten vermehrt mononukleäre Zellen am Reaktionsort auf (Tizard, 1981).

Die DTH tritt erst zwischen 6 und 24 Stunden nach Antigeninjektion in die Haut vorsensibilisierter Tiere auf. Das klassische Beispiel der lokalen DTH ist die Tuberkulinreaktion. Die histologische Untersuchung zeigt im Unterschied zur akuten Entzündung, der Arthus- Reaktion, daß es sich bei den Infiltraten, die neben erhöhter Gefäßdurchlässigkeit und Ödematisierung auftreten, vorwiegend um mononukleäre Zellen, also Makrophagen und zum Teil Lymphozyten, handelt. Lediglich in der Frühphase der Reaktion ist auch eine deutliche Neutrophilenansammlung zu beobachten. 24 - 72 Stunden nach Injektion erreichen die Veränderungen ihren Höhepunkt und können für Wochen persistieren. Diese Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ ist T- Zell- vermittelt, wobei die

Makrophagenansammlung auf die Freisetzung chemotaktischer Faktoren zurückzuführen ist. Die Entstehung von aktivierten Makrophagen fällt oft mit dem Auftreten einer verzögerten Überempfindlichkeit gegenüber fakultativ intrazellulären Bakterien zusammen (Tizard, 1981).

Die DTH eignet sich sehr gut zum Nachweis einer Immunität gegen den betreffenden Erreger (Mayr et al., 1984).

Da die Sensibilisierungsperiode (d.h. die Zeit zwischen Antigen- Erst- und -Zweitkontakt) der DTH kürzer ist als die der Arthus- Reaktion, kann es bei Vorliegen beider Allergietypen zu einer Überlagerung des Soforttyps durch den Spättyp kommen (Rolle/Mayr, 1984).

Da es bei jeder Infektionskrankheit, bei deren Abwehr zelluläre Immunmechanismen beteiligt sind, zur Auslösung von Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ kommen kann, wird beim Rind auch ein Hauttest zum Nachweis einer *Salmonella typhimurium*- Infektion bzw. der Auslösung einer Immunität gegen letztere verwendet (Aitken, 1978; Robertsson et al., 1982; Lindberg und Robertsson, 1983; Merritt, 1984).

Zahlreiche Autoren lösen eine DTH bei der gegen Salmonellose immunisierten Maus durch Injektion von Salmonellen in die Fußsohle (sog. Footpadtest) aus. Als Parameter wird in bestimmten Zeitabständen die Dickenzunahme der Fußsohle in Form der Differenz zur Dicke der kontralateralen, nicht Antigen- injizierten Fußsohle bestimmt (Collins und Mackaness, 1968; Hormaeche, 1979; Udhayakumar und Muthukkaruppan, 1987).

Collins und Mackaness (1968) berichten über das Auftreten einer typischen DTH- Reaktion bei mit lebenden *Salmonella gallinarum*- Bakterien immunisierten

Mäusen, denen 8 Tage nach der Immunisierung Salmonellenwandtoxine in die Fußsohle injiziert wurden. Nach Aussage der Autoren ist die Footpadschwellung 24 Stunden nach der Injektion wesentlich stärker als 3 Stunden danach, übereinstimmend mit einer Reaktion vom verzögerten Typ. Die histologische Untersuchung der Footpads ergibt nach 3 Stunden eine kleine Zellpopulation, die auch in den Kontrollfüßen, vermutlich als Folge des Injektionstraumas, auftritt. Nach 24 - 48 Stunden ist das Zellinfiltrat vorwiegend mononukleärer Natur. Bei Mäusen, die erst am 20. Tag nach i.v.- Immunisierung mit Lebend- *Salmonella gallinarum* in die Fußsohle injiziert wurden, zeigt sich Collins und Mackaness zufolge eine gemischte Arthus-DTH- Reaktion.

Auch Cho et al. (1983) stellen ab der 4. Woche nach i.p.- Immunisierung mit einem Lebend- *Salmonella typhimurium*- Stamm eine abnehmende DTH- typische Footpadschwellung nach Injektion abgetöteter *Salmonella typhimurium*- Keime in die Fußsohle fest.

Andere Angaben machen George et al. (1987), die eine Abnahme der Footpad- DTH- Reaktion erst ca. 9 Wochen nach i.p.- Immunisierung von Mäusen mit *Salmonella enteritidis* beobachteten.

Die Injektion hochgereinigten, damit LPS- freien Proteins der Salmonellenaußenmembran ("porin") in die Fußsohle zuvor mit lebenden Salmonellen immunisierter Mäuse erzeugt eine reine DTH mit Vorherrschenden mononukleärer Zellen. Der mit LPS verunreinigte Proteinextrakt der Bakterienaußenmembran (OMP) ist verantwortlich für die Infiltration der Reaktionsstelle mit neutrophilen Granulozyten. Die Injektion von OMP in die Fußsohle immunisierter Mäuse führt somit zu keiner reinen spät reagierenden zellulären Überempfindlichkeit (Udhayakumar und

Muthukkaruppan, 1987b). Nach Mitteilung der Autoren ist die Reinheit der DTH- Reaktion abhängig von der Reinheit des Proteinextraktes der Salmonellenaußenmembran, der zur Auslösung der Footpadreaktion verwandt wird.

Mit einer Totvaccine immunisierte Mäuse entwickeln nach Angaben von Cho et al. (1983) nach Injektion mit lebenden *Salmonella cholerae suis*- Keimen keine DTH-, sondern eine Arthus- Typ- Reaktion.

Nach Bestimmung der Wachstumskurve der Salmonellen in Leber und Milz der Mäuse kommen Collins und Mackaness (1968) zu dem Schluß, daß die Absenkung dieser Kurve mit dem Auftreten der DTH zusammenfällt und somit die Eliminierung der Erreger von der zellulären Immunität abhängig ist.

Im Gegensatz zu Collins und Mackaness (1968), Smith und Bigley (1972) und Mitsuyama et al. (1982), die das gleichzeitige Auftreten von DTH- positiver Footpadreaktion und zellvermittelter Immunität bereits 8 Tage nach Injektion feststellen, halten Hormaeche et al. (1981) die Footpadreaktion nicht für ein unbedingt verlässliches Kriterium der erworbenen zellulären Immunität gegen eine *Salmonella typhimurium*- Infektion. Nach Aussage der Autoren fällt der Footpadtest erst 2 - 3 Wochen nach Auftreten der zellvermittelten Immunität DTH- positiv aus. Diese zellvermittelte Immunität ist, wie das Schicksal einer Superinfektionsdosis im MPS der Maus zeigt, schon eine Woche nach Erstinfektion mit virulenten Salmonellen vorhanden. Hormaeche et al. (1981) untermauern diesen Befund mit dem Ergebnis einer früheren Studie (Hormaeche et al., 1979). Die histologische Untersuchung der 8 Tage nach Immunisierung getesteten Footpads zeigt 48 Stunden nach Infektion mononukleäre Zellen und polymorphkernige Leukozyten,

aber keine Anzeichen einer eindeutigen DTH- Reaktion. In einigen Arealen der Schnitte sind polymorphkernige Leukozyten sogar der vorherrschende Zelltyp.

Killar und Eisenstein (1983 u. 1984) diskutieren die Ergebnisse von Collins und Mackaness (1968) und stellen Unterschiede in der Fähigkeit verschiedener Mäusestämme fest, eine DTH nach einer Salmonelleninfektion zu entwickeln. Mäusestämme mit einer angeborenen hohen Empfänglichkeit für Salmonelleninfektionen bilden nach Impfung mit avirulenter Lebendvaccine eine gute Immunität gegen eine Infektion mit virulenten Salmonellen, zeigen aber keine DTH- Reaktion. Genetisch resistente Tiere zeigen Immunität und DTH in Form entsprechender Footpadreaktionen.

In einer weiteren Studie korrelieren Killar und Eisenstein (1986) ihre Ergebnisse bei verschiedenen Mäusestämmen mit der *Salmonella typhimurium*- Immunisierungsdosis. Mäuse mit angeborener Überempfindlichkeit entwickeln bei keiner Impfdosis eine DTH, aber eine Dosis von 9×10^4 avirulenten *Salmonella typhimurium* führt zu einer deutlichen Immunität. Die genetisch resistenten Mäusestämme entwickeln schon ab einer Impfdosis von 9×10^3 avirulenten *Salmonella typhimurium* eine belastbare Immunität, aber erst ab einer Immunisierungsdosis von 9×10^4 Erregern eine DTH mit entsprechender Footpadreaktion. Die Autoren sehen in der Überlebensrate der Tiere ein geeigneteres Maß für die Entwicklung einer Immunität als in der DTH- Reaktion.

Die Immunität und die Fähigkeit zur Ausbildung einer DTH mit entsprechender Footpadschwellung kann durch Milzzellen bzw. T-Zellfraktionen immunisierter Spendermäuse auf normale Empfänger-mäuse übertragen werden. Die Übertragung einer DTH und damit einer

zellvermittelten Immunität durch eine B-Zellfraktion oder ein Immunserum gelingt nicht (Collins und Mackaness, 1968; Smith et al., 1982; Cho et al., 1983; Attridge und Kotlarski, 1985; Chander et al., 1986). Die durch T-Zelltransfer vermittelte Immunität von Empfänger-mäusen entspricht ca. 80% der durch eine aktive Immunisierung erreichten Resistenz (Kita et al., 1986).

Dagegen erreichen Killar und Eisenstein (1985) nur durch Transfer von spätestens eine Woche nach Immunisierung mit avirulenten Salmonellen aus Spender-mäusen gewonnenen Milzzellen die Auslösung einer DTH, verbunden mit einer Immunität bei Empfänger-mäusen, denen Salmonellen injiziert wurden. Durch Übertragung einer T-Lymphozytenreichen Zellfraktion können die Autoren keine Immunität in Empfänger-mäusen bewirken. Immunmakrophagenreiche Zellfraktionen aus Spendermäusen sind dagegen in der Lage, Immunschutz auf Empfänger-mäuse zu übertragen.

Attridge und Kotlarski (1985) injizieren sensibilisierte T-Zellen aus zuvor mit Salmonellen immunisierten Mäusen und spezifisches Salmonellenantigen in die Fußsohlen nicht geimpfter Empfänger-mäuse. Die erzeugte Schwellung bietet ein sehr gutes Korrelat der klassischen DTH- Antwort aktiv immunisierter Mäuse. In beiden Fällen ist die Schwellungsreaktion charakterisiert durch Infiltration mit mononukleären Zellen. Nach Aussage der Autoren setzen die T-Zellen Lymphokine frei, die Zahl und bakterizide Aktivität von Gewebemakrophagen steigern.

Askenase et al. (1983) betonen, neben der Bedeutung der T-Zellen für die Übertragung einer DTH, deren Funktion bei der Anregung von ortsansässigen Gewebemastzellen, Serotonin freizusetzen, wodurch eine erhöhte Gefäßpermeabilität mit verstärkter Leukozytenemigration bewirkt wird. Die o.g. Autoren halten da-

mit einer indirekten Beteiligung der T-Zellen an der Überempfindlichkeit vom Soforttyp für möglich.

Kita et al. (1986) zufolge spielen die T-Zellen erst in der Spätphase nach einer Immunisierung eine entscheidende Rolle für die Immunantwort auf einen Salmonellenantigen.

Ca. 9 Wochen nach i.p.- Immunisierung von Mäusen mit *Salmonella enteritidis* bemerken George et al. (1987) eine Abnahme der DTH und gleichzeitige Zunahme protektiver Immunität. Damit werden nach Mitteilung der Autoren DTH und protektive Immunität vermutlich durch unterschiedliche Subklassen von T-Zellen vermittelt.

5. Immunhistochemie

5.1. Grundlagen und Methoden

Die Methodik der Immunhistochemie ermöglicht die Identifikation von Antigenen im Gewebeschnitt bzw. in Zellpräparationen. Das Prinzip beruht auf einer durch Verwendung markierter Antikörper optisch erfassbaren Antigendarstellung via Antigen- Antikörper-Reaktion (Denk, 1986).

Für lichtmikroskopische Untersuchungsverfahren werden Fluorochrome (FITC, Rhodaminwasserstoff) oder Enzyme (Peroxidase, Phosphatase) zur Markierung von Antikörpern verwandt.

Die Anfang der 40er Jahre entwickelte Immunfluoreszenz- (IF-) methodik (Coons, 1942) ist bis heute als bewährtes Verfahren gebräuchlich, weist jedoch eine Reihe von Nachteilen auf: 1.) Die Notwendigkeit von Frischmaterial für Gefrierschnitte begrenzt die Anwendungsmöglichkeiten der IF. 2.) Die

Untersuchung der Cryostatschnitte ist nur mittels Fluoreszenzmikroskopie ist möglich. 3.) Infolge Fehlens einer permanenten Anfärbung der IF- Schnitte ist eine wiederholte Untersuchung derselben Schnitte nur eingeschränkt durchführbar. 4.) Die Darstellung der Gewebemorphologie in Gefrierschnitten im Vergleich zu Paraffinschnitten ist mangelhaft. 5.) Das Auftreten einer gewissen Gewebsautofluoreszenz erschwert die Beurteilung. (Mesa- Tejada et al., 1977; Taylor, 1978; De Lellis et al., 1979; Heyderman, 1979; Hsu und Ree, 1980; Nadji und Morales, 1983; Denk, 1986).

Die Mitte der 60er Jahre eingeführten enzymimmuno-histochemischen Verfahren (Nakane und Pierce, 1966) besitzen gegenüber den Methoden der Immunfluoreszenz eine Reihe von Vorzügen. Aufgrund ihrer hohen methodischen Empfindlichkeit ist eine Anwendung an routinemäßig in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Material möglich (De Lellis et al., 1979; Heyderman, 1979). Dadurch können viele Antigene direkt durch Lichtmikroskopie sichtbar gemacht werden, wobei morphologische Details gut erhalten bleiben und durch eine Gegenfärbung besser beurteilbar sind. Eine retrospektive Untersuchung des in Form von Paraffinblöcken gelagerten Materials ist damit möglich (Taylor, 1978; Hsu und Ree, 1980; Vandevelde, 1983). Darüber hinaus sind diese Methoden auch für elektronenmikroskopische Untersuchungen geeignet (Moriarty et al., 1973).

Die Immunfluoreszenzmethoden sind allerdings weniger zeitaufwendig (Taylor, 1978). Außerdem ist die Formalinfixierung des Gewebes verantwortlich für eine gewisse Reduzierung der Antigenität nachzuweisender Substanzen bei den IP- Methoden (Hsu et al., 1981a).

Verschiedene Variationen der Immunperoxidase- Methode wurden beschrieben, die enzymatische Aktivität von Meerrettichperoxidase in Verbindung mit einem chromogenen Substrat nutzend (Petrusz et al., 1980).

Bei der direkten IP- Technik wird das Antigen durch Bindung eines mit Meerrettichperoxidase markierten primären Antikörpers nachgewiesen. Die indirekte Methode beruht auf zwei Inkubationsschritten. Die Bindung des primären unmarkierten Antikörpers wird durch einen sekundären, gegen den ersten Antikörper gerichteten und markierten Antikörper nachgewiesen (Nakane und Pierce, 1966; Seifert et al., 1984).

Diese sog. konjugierten Methoden haben den Nachteil, daß die chemische Kopplung von Antikörper und Enzym sowohl die Immunreaktivität des Antikörpers als auch die Aktivität des Enzyms hemmen kann (Sternberger, 1969; Bosman et al., 1983;) bzw. freies Enzym oder unkonjugierte Antikörper vorliegen können (Falini und Taylor, 1983).

Der Vorteil unkonjugierter Methoden liegt in der Verwendung ungekoppelter Antikörper und dadurch gewährleisteter optimaler Immunreaktivität (Denk, 1986).

Bei der unkonjugierten, von Sternberger et al. (1970) eingeführten Peroxidase- Antiperoxidase (PAP)- Komplex- Methode wird ein Meerrettichperoxidase- Antiperoxidase- Komplex durch einen sekundären Antikörper an den primären Antikörper (aus der gleichen Spezies wie der Peroxidase- Antikörper) fixiert. Die Reaktion wird durch Zugabe eines für die Peroxidase spezifischen Chromogens in Form eines farbigen Endproduktes im Lichtmikroskop sichtbar gemacht. Die Peroxidase katalysiert dabei die Oxidation des Farbstoffes (z.B. AEC = 3- Amino-

9- Äthylcarbazol) durch H_2O_2 (Graham et al., 1965; Pearse, 1972). Nach Sternberger et al. (1979) ist die PAP- Methode 100-1000fach empfindlicher als die Immunfluoreszenz. Im Vergleich mit den Peroxidase-markierten- Antikörper- Methoden liegt für das PAP- Verfahren eine mindestens 20fach höhere Sensitivität vor (Burns, 1975).

Die hohe Sensitivität der häufig eingesetzten PAP- Methode wird auf die Anwesenheit von 3 Peroxidase- molekülen in einem PAP- Komplex zurückgeführt. Dies resultiert im Vergleich mit den konjugierten Methoden in einer größeren Anzahl von Enzymmolekülen pro Bindungsstelle des Antikörpers am Antigen. Die Folge ist eine intensivere spezifische Färbung der Schnitte (Sternberger, 1979; Falini und Taylor, 1983). Die Nachteile einer chemischen Antikörper- Enzym- Kopplung wie Denaturierung von Antikörpern, Inaktivierung von Enzymen und Aggregation unmarkierter oder teilweise markierter Antikörper, werden vermieden (Taylor, 1978). Bei der PAP- Komplex- Methode binden nur diejenigen spezifischen, sekundären Antikörper den PAP- Komplex, die mit dem primären Antikörper reagiert haben (Bosman et al., 1983).

Die Avidin- Biotin- Verfahren beruhen auf der hohen Affinität des Glycoproteins Avidin zum Vitamin Biotin (Wood und Warnke, 1981). Avidin ist ein hoch- molekulares Glycoprotein des Hühnereiweißes mit einem Molekulargewicht von 68000 (Hsu et al., 1981a; Hsu und Raine, 1984). Die Affinität von Avidin zu Biotin findet ihren Ausdruck in einer sehr hohen Dissoziationskonstante der Verbindung von $10^{-15} M^{-1}$ (Giorno, 1984). Im Vergleich dazu liegt die Dissoziationskonstante von Systemen, die auf einer reinen Antigen- Antikörper- Wechselwirkung beruhen, im Bereich von 10^{-6} bis $10^{-8} M^{-1}$ (Eisen und Siskind,

1964). In jedem Avidinmolekül existieren 4 Bindungsstellen für Biotin, das an verschiedene Substanzen, wie z.B. Immunglobuline, gebunden werden kann (Denk, 1986).

Erstmals haben Guesdon et al. (1979) zwei unterschiedliche Verfahren entwickelt, die die Avidin-Biotin- Wechselwirkung immunhistochemisch ausnützen. Bei der sog. markierten Avidin- Biotin- Technik werden Biotin- markierter Antikörper und Enzym-markiertes Avidin aufeinanderfolgend verwandt. Die zweite, sog. Brücken- Avidin- Biotin- Technik beruht auf der Funktion von Avidin als Brücke zwischen Biotin- markiertem Antikörper und Biotin- markierten Enzymen. Beide Methoden benötigen eine Konjugation von Biotin mit dem primären Antikörper, welche für die Verwendung in der immunhistopathologischen Routinediagnostik unzweckmäßig ist (Hsu et al., 1981a).

Eine signifikante Steigerung der Sensitivität läßt sich durch die routinemäßig anwendbare Avidin-Biotin- Peroxidase- Komplex (ABC)- Methode erreichen (Hall und Ward, 1984). Avidin bildet dabei einen stabilen Komplex mit der an Biotin gebundenen Peroxidase; dieser Komplex reagiert mit einem biotinilierten, sekundären Antikörper. Dieser Brückenantikörper verbindet den Avidin- Biotin- Komplex mit dem unmarkierten, primären Antikörper (Denk, 1986). Mehrere Biotinmoleküle können im Komplex an ein Peroxidasemolekül gekoppelt sein. Avidin agiert als Brücke zwischen mehreren dieser Biotin- Peroxidase-Konjugate, die wiederum Avidinmoleküle miteinander verbinden. So entsteht ein gitterartiger Komplex, der zahlreiche Peroxidasemoleküle enthält (Hsu et al., 1981a; Hsu und Raine, 1984). Hierin besteht ein Vorteil gegenüber der PAP- Methode, bei der nur 3 Peroxidasemoleküle im Komplex vorhanden sind. Die

ABC- Methode resultiert in einer stärkeren Intensität der Färbung. Die Bildung des "Gitter- Komplexes" erlaubt die Verwendung von primärem und sekundärem Antikörper in sehr viel höherer Verdünnung als bei der PAP- Methode (Hsu et al., 1981b; Hsu und Raine, 1981). Diese Feststellung wird durch Ergebnisse von Hall und Ward (1984) bestätigt. Nach Denk (1986) ist die Sensitivität der ABC- Methode 8-40mal höher als die des PAP- Verfahrens. Die hochverdünnten Antikörper bedingen eine geringere unspezifische Anfärbung des Hintergrundes und damit eine bessere Kontrastierung (Hsu und Raine, 1984; Giorno, 1984).

Hsu und Raine (1981) zufolge besteht der Hauptvorteil des ABC- Verfahrens in dem breiten Spektrum seiner Anwendbarkeit. Im Gegensatz zur PAP- Methode ist das ABC- System unabhängig vom primären Antikörper einsetzbar. Der bei der PAP- Technik verwendete Komplex hat dem primären Antikörper bezüglich Spender- Spezies zu entsprechen.

Ein Nachteil der ABC- Methode ist die gelegentlich auftretende unspezifische Bindung des ABC- Reagens an Nervenfasern, Leber-, Pankreas- und Nierengewebe (Denk, 1986). Diese falsch positive Färbung wird auf eine Bindung von Avidin an endogenes Biotin in diesen Organen zurückgeführt (Falini und Taylor, 1983). Die Bindung an Nervenfasern kann durch Vorbehandlung des Gewebes mit Alpha- Methyl- D- Mannosid verhindert werden (Hsu und Raine, 1984). Die Avidin-Bindungsaktivität des endogenen Biotins der zuvor genannten parenchymatösen Organe wird durch eine Vorbehandlung des Gewebes mit Avidin und Biotin unterdrückt (Wood und Warnke, 1981; Hsu und Raine, 1984). Darüber hinaus werden bei der ABC- Technik Mastzellen unspezifisch angefärbt (Denk, 1986). Tharp et al. (1985) zufolge ist Avidin für die Bindung des Avidin- Biotin- Komplexes an Mastzell-

granula verantwortlich. Durch Verwendung einer ABC-Lösung von pH 9,4 statt wie allgemein empfohlen pH 7,6 soll diese unspezifische Färbung vermeidbar sein (Bussolati und Gugliotta, 1983). Hsu und Raine (1984) gelingt es jedoch weder in Gefrier- noch in Paraffinschnitten, diese falsch-positive Mastzellanfärbung zu verhindern.

Denk (1986) empfiehlt für die Verwendung Formalinfixierten Materials sowohl bei der ABC- als auch bei der PAP-Methode die Vorbehandlung der Schnitte mit einer Protease. Eine Trypsinbehandlung von Paraffinschnitten ermöglicht eine intensivere Wechselwirkung von Antigenen und Antikörper durch Verbesserung der Gewebespermeabilität (Curran und Gregory, 1977). Die bei der PAP-Technik stärkere unspezifische Anfärbung des Hintergrundes kann bei beiden Methoden durch Blockierung unspezifischer Bindungsstellen im Gewebe mit Normalserum (Taylor, 1978) bzw. Blockade endogener Peroxidaseaktivität mit Methanol- H_2O_2 (Streefkerk, 1972) vermindert werden.

5.2. Anwendung

Im Rahmen der Immunhisto- und -zytochemie finden die verschiedenen Immunperoxidaseverfahren auf den Gebieten der Tumordiagnostik, der Erfassung immunpathologischer Reaktionen und des Erregernachweises zunehmend spezielle Anwendung (Seifert et al., 1984).

Ein breites Spektrum von Zellprodukten mit Proteincharakter, z.B. Enzyme (Halverson et al., 1981), Hormone (Fishleder et al., 1982; Childs und Unabia, 1982) und Komponenten des sog. Zytoskelettes wie

Aktin (Bussolati et al., 1980) oder Keratin (Pinkus et al., 1985), wird mit Immunperoxidasetechniken dargestellt.

Eine Vielzahl dieser Zellprodukte wird in der Tumordiagnostik als Tumormarker, d.h. Substanzen, die entweder von Tumorzellen sezerniert werden oder im Zytoplasma bzw. an der Zellmembran von Tumorzellen nachweisbar sind, verwandt (Denk, 1986). Besondere Bedeutung haben die Intermediärfilamente (Keratin, Vimentin, Desmin) als Elemente des Zytoskelettes für die Klassifikation von epithelialen und mesenchymalen Tumoren (Seifert et al., 1984). Die Identifizierung von endokrinen Tumoren wird durch den immunhistochemischen Nachweis bestimmter Polypeptid- oder Steroidhormone in solchen Fällen ermöglicht, in denen die konventionelle Histologie nicht zum Ziel führt (Heitz, 1986).

Die Erfassung immunpathologischer Reaktionen mit Immunperoxidaseverfahren, wie der PAP- oder ABC-Technik, dient beispielsweise der Abgrenzung autoimmuner Hauterkrankungen von anderen Dermatopathien (Moore et al., 1987; Haines et al., 1987).

Der Nachweis von Infektionserregern im Gewebeschnitt mit Hilfe immunhistochemischer Methoden ist hochspezifisch; das Spektrum der auf diese Weise nachgewiesenen Erreger umfaßt Viren, Pilze und bakterielle wie protozoische Mikroorganismen (Seifert et al., 1984).

Besonders auf dem Gebiet der Virusdiagnostik liegen zahlreiche Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen vor. Speziell mit der PAP-Komplex-Methode wurden Parvoviridae (Macartney und Macartney, 1986), Herpesviridae (Ducatelle et al., 1982; Bedrossian et al., 1984), Reoviridae (Cherrington et

al., 1985), Paramyxoviridae (Ducatelle et al., 1980), Rhabdoviridae (Palmer et al., 1985; Bourgon und Charlton, 1987) und Coronaviridae (Chu et al., 1982) nachgewiesen. Hall und Ward (1984) stellen Sendai- (Parainfluenza-) virus in der Lunge von Mäusen mit einer PAP- und einer ABC- Komplex- Methode dar. Nach Aussage der Autoren ist der Virusnachweis mit der ABC- Technik sensitiver als mit der PAP- Methode.

Bei einer Lungenaspergillose vom Kaninchen gelingt Rudolph et al. (1978) der Nachweis von unmittelbar an die Zellwand der Pilze angrenzenden Antigen-Antikörper- Präzipitaten mit einer PAP- Komplex- Methode.

In der Literatur liegen einzelne Angaben über den immunhistochemischen Nachweis von Protozoen vor. Beispielsweise wiesen Stiglmair- Herb und Pospischil (1987) Kryptosporidien und Toxoplasmen in verschiedenen Organen von Gazellen mit einer ABC- Komplex- Technik nach.

Vergleichbar wenige Mitteilungen sind in der Literatur über den immunhistochemischen Nachweis von Bakterien zu finden.

Erstmals haben Sternberger et al. (1970) mit Einführung der PAP- Methode das Schraubenbakterium *Treponema pallidum* in auf Objektträgern fixierten Hodengewebssuspensionen von experimentell infizierten Kaninchen nachgewiesen.

Die Lokalisation von *Bacillus cereus*- Antigenen im Elektronenmikroskop mit Hilfe der PAP- Technik wird von Short und Walker (1975) beschrieben. Dabei werden Sporenantigene während der Sporulation im Zytoplasma vegetativer Zellen erfaßt, während die Antigene der vegetativen Zellen selbst auf der Zellwand lokalisiert werden können.

Die PAP- Komplex- Methode besitzt eine hohe Sensi-

tivität für den Nachweis von *Chlamydia psittaci* in Konjunktiva- Kürettage- Proben von Katzen mit einer feline *Chlamydia*- Keratokonjunktivitis (Woodland et al., 1978).

McRill et al. (1984) verwenden die *Salmonellen*stämme *cholerae suis* var. *kunzendorf*, *dublin* und *typhimurium* als Testorganismen. Nach Aussage der Autoren ist jeder der drei Serotypen in Objektträgerausstrichen von formalinisierten Zellsuspensionen, lebenden Reinkulturen und Gewebesuspensionen von Leber und Milz experimentell infizierter Mäuse mit der PAP- Methode nachweisbar. Daneben ist der *Salmonella cholerae suis*- Stamm in Formalin- fixiertem und Paraffin- eingebettetem oder gefrorenem Gewebe experimentell infizierter Schweine darstellbar. Die PAP- Färbetechnik wird an Gewebeschnitten verschiedener Organe wie Lunge, Leber, Milz, Lymphknoten und mehreren Darmlokalisationen angewandt. Nur im Zäkum sind zahlreiche *Salmonella*- Keime in Lumen und Darmdrüsen zu erfassen. In den anderen Organen sind nur einzelne Bakterien weit verteilt in den Gewebeschnitten und selten im Bereich von histologisch erkennbaren Läsionen zu ermitteln. Den Autoren zufolge liegt der Hauptnutzen der PAP- Methode in der gegenüber biochemischen Methoden schnelleren Identifikation von Reinkulturen.

Pospischil und Wood (1986) weisen *Salmonella typhimurium*- Keime mittels einer PAP- Komplex- Technik in Formol- fixierten und Paraffin- eingebetteten Geweben experimentell infizierter Schweine licht- und elektronenmikroskopisch nach. Die Keime sind in Tonsillen, Oesophagus, Mesenteriallymphknoten und sämtlichen Darmabschnitten (außer Duodenum) zu lokalisieren. Die Elektronenmikroskopie in Verbindung mit der PAP zeigt eine geringe Tendenz der Bakterien, in die Schleimhaut einzudringen. Nach Mitteilung der

Autoren sind die *Salmonella typhimurium*- Erreger nach einer Invasion eher in Interzellularspalten oder Gefäßen der Lamina propria zu sehen als in Makrophagen.

Das PAP- Komplex- Verfahren eignet sich auch zur Ermittlung von K99- Pilus- Antigenen enterotoxischer *Escherichia coli*- Keime in Paraffin- eingebettetem Dünndarmgewebe von Schweinen (Rogers, 1985). Nur die Fixierung des Gewebes für 24 Stunden in kaltem (4°C) Formalin, gefolgt von einer Dehydrierung in kaltem Methanol, sichert den optimalen Erhalt der Antigenität.

Auch eine spezifische Identifizierung von *Moraxella bovis* in Formol- fixiertem und Paraffin- eingebettetem Corneagewebe von Rindern mit infektiöser boviner Keratokonjunktivitis ist mit der PAP- Methode möglich (Turfrey, 1985).

Es liegen Ergebnisse über den Nachweis von *Listeria monocytogenes* mit der PAP- Technik in routinemäßig in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Mäusegewebe vor (Domingo et al., 1986). Leber und Milz der infizierten Mäuse zeigen fokale Nekrosen. Im Zentrum der Lebernekrosen sind zahlreiche Bakterien zu finden; im Zytoplasma unmittelbar benachbarter Hepatozyten können nur vereinzelt Listerien nachgewiesen werden. Die nekrotischen Areale in der Milz weisen intra- und extrazelluläre Erregerlokalisationen auf. Die Immunhistologie ist den o.g. Autoren zufolge vor allem für die Diagnose nicht oder schlecht anzüchtbarer bakterieller Erreger von großem Nutzen.

Anderson et al. (1986) stellen *Brucella abortus*- Keime in Formalin- fixiertem und routinemäßig eingebettetem Plazentagewebe experimentell infizierter Ziegen mit einer Avidin- Biotin- Komplex- Methode

dar. Das Zytoplasma der Epithelzellen infizierter Trophoblasten enthält zahlreiche, den Zellkern umgebende *Brucella abortus*- Erreger.

Ebenso liegen Ergebnisse einer Untersuchung von Meador et al. (1986) über die Anwendung einer ABC-Technik zum Nachweis von *Brucella abortus* in verschiedenen fetalen Ziegenorganen, der Plazenta von Rind und Ziege und der Milz von Mäusen vor. Die Brucellen sind in den Formol- fixierten und Paraffin- eingebetteten Geweben sowohl intra- als auch extrazellulär zu identifizieren. Eine positive Färbung tritt intrazellulär in Phagozyten und Chorionepithelzellen auf, wobei sie den ganzen Zytoplasmaraum ausfüllen kann. Extrazellulär liegende Brucellen finden sich nach Aussage der Autoren in Gefäßlumina bzw. im Interstitium fetaler Gewebe. Die Intensität der Färbung von in 10% Formol fixierten Geweben ist Meador et al. (1986) zufolge unabhängig davon, ob die Fixationsdauer 24 Stunden oder 4 Monate beträgt.

Haritani et al. (1987) gelingt die Darstellung von *Pasteurella hämolytica* in Paraffinschnitten von Formalin- fixiertem Lungengewebe experimentell infizierter Kälber mit der Avidin- Biotin- Komplex- Methode. Im Zentrum koagulationsnekrotischer Gewebsareale ist das Bakterienantigen infolge Zerstörung der Erreger diffus nachweisbar. Daneben sind die Pasteurellen, der Nekrose benachbart, in Gruppen degenerierender Leukozyten und im Zytoplasma von Alveolarmakrophagen zu finden.

C. MATERIAL UND METHODEN

1. In- vivo- Versuche

Die in- vivo- Versuche wurden in Zusammenarbeit mit dem Department of Microbiology and Preventive Medicine, School of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa 50011, USA, durchgeführt.

1.1. Tiermaterial

Für den Versuch wurden konventionell gehaltene, adulte Auszuchtmäuse beiderlei Geschlechts verwendet. Futter und Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung.

1.2. Durchführung der in- vivo- Versuche

(Prof. T. T. Kramer)

1.2.1. Versuch 86-3

Der Versuch umfaßte 5 Impfgruppen von je 14 Mäusen. Die verschiedenen Tiergruppen wurden mit unterschiedlichen Dosen ($1,4 \times 10^4$, $\times 10^5$, $\times 10^4$, $\times 10^5$, $\times 10^6$) des lebenden avirulenten *Salmonella cholerae suis*- Stammes 33-13 in 0,2 ml phys. NaCl- Lösung subkutan am Hals immunisiert. Die als Kontrollgruppe dienenden 14 Tiere erhielten stattdessen zeitgleich lediglich eine subkutane Injektion von 0,2 ml phys. NaCl- Lösung. In einem zeitlichen Abstand von 30 Tagen erfolgte bei sämtlichen Tieren aller Gruppen eine Injektion von $1,6 \times 10^4$ lebenden Erregern des virulenten *S. cholerae suis*- Stammes 38-9 in 0,05 ml phys. NaCl- Lösung subkutan in die Sohle des linken Hinterfußes. In die kontralaterale Fußsohle wurden 0,05 ml phys. NaCl- Lösung injiziert. Den Angaben in der Literatur entsprechend (Collins

und Mackaness, 1962, wird die Dicke der Antigeninjizierten Fußsohle als Differenz zur Dicke der NaCl- injizierten kontralateralen Fußsohle durch Messung mit einem Mikrometer bestimmt. Die Messung erfolgte in Zeitabständen von 1, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden. Einzelne, repräsentativ ausgewählte Tiere verschiedener Impfgruppen wurden nach der Messung getötet und die distalen Hinterextremitäten zur histopathologischen Untersuchung in 7% gepufferter Formalin fixiert (Tabelle 1).

1.2.2. Versuch 86-5

Dieser Versuch umfaßte 2 x 5 Tiergruppen von je 14 Mäusen. Den Mäusen der Gruppen 86-5/ I-V (Tabelle 2) wurden ohne vorherige Immunisierung $1,2 \times 10^3$ lebende Erreger des avirulenten *S. cholerae suis*- Stammes 33-13 in 0,05 ml phys. NaCl- Lösung subkutan in die linke hintere Fußsohle injiziert. Eine entsprechende Injektion erfolgte ebenso ohne vorherige Immunisierung bei den Mäusen der Gruppen 86-5/ VI-X (Tabelle 3) mit $1,6 \times 10^3$ lebenden Erregern des virulenten *S. cholerae suis*- Stammes 38-9. Die Messung der Fußsohlendicke wurde bei sämtlichen Gruppen in identischen Zeitabständen nach Injektion mittels der bei Versuch 86-3 angewandten Messtechnik vorgenommen. Von insgesamt 42 Tieren dieser Versuchreihe wurden die distalen Hinterextremitäten zur histopathologischen Untersuchung in 7% gepuffertem Formalin fixiert (Tabellen 2 und 3).

1.2.3. Versuch 86-8

Es wurden 4 Gruppen von je 7 Mäusen in diesem Versuch zusammengefaßt. Die Tiere der Gruppen 86-8/ I und III wurden durch Injektion von 10^3 lebenden Er-

regern des avirulenten *S. cholerae suis*- Stammes 33-13 subkutan in die linke hintere Fußsohle immunisiert. Bei den Mäusen der Gruppen 86-8/ II und IV erfolgte keine Immunisierung.

Den Tieren der Gruppe 86-8/ I wurde 30 Tage nach Vorimmunisierung zeitgleich mit Gruppe 86-8/ II 1 µg OMP aus *S. cholerae suis*- Stamm 38-9 in 0,05 ml phys. NaCl- Lösung in die Fußsohle der kontralateralen Hinterextremität injiziert. Der Gruppe 86-8/ IV wurde gleichzeitig mit der 30 Tage zuvor immunisierten Gruppe 86-8/ III 10⁵ lebende Erreger des virulenten *S. cholerae suis*- Stammes 38-9 subkutan in die rechte hintere Fußsohle injiziert.

Die Messung der Fußsohlendicke erfolgte nach dem gleichen Verfahren wie bei Versuch 86-3 in Zeitabständen von 4, 24 und 48 Stunden.

Von 4 repräsentativ ausgewählten Tieren jeder Gruppe wurden die distalen Hinterextremitäten zur histopathologischen Untersuchung in 7% gepuffertem Formalin fixiert (Tab. 4).

2. Untersuchungsmaterial

Aus jeder Versuchsreihe wurden uns die in 7% gepuffertem Formalin fixierten distalen Hinterextremitäten repräsentativ ausgewählter Mäuse freundlicherweise von Prof. Dr. T. T. Kramer (Head of Department Microbiology and Preventive Medicine, Iowa State University, School of Veterinary Medicine, Ames, Iowa 50011, USA) für die histopathologische Untersuchung zur Verfügung gestellt. Die näheren Angaben sind den nachfolgenden Tabellen 1-4 zu entnehmen.

Tabelle 1: Versuch 86-3

Tiergruppen- nummer	Immunisierung mit <i>S. cholerae suis</i> (Stamm 33-13, lebend)	Fußsohleninjektion li. mit <i>S. cholerae suis</i> (Stamm 38-9, lebend)	$\Delta t(h)^*$	n**
	Dosis	Dosis		
I	$1,4 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$	48	2
II	$1,4 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$	72	5
III	$1,4 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$	96	3
IV	$1,4 \times 10^2$	$1,6 \times 10^4$	96	3

Tabelle 2: Versuch 86-5/ I-V

Tiergruppen- nummer	Fußsohleninjektion li. mit <i>S. cholerae suis</i> (Stamm 33-13, lebend)	$\Delta t(h)^*$	n**
	Dosis		
I	$1,2 \times 10^3$	24	5
II	$1,2 \times 10^3$	48	4
III	$1,2 \times 10^3$	72	4
IV	$1,2 \times 10^3$	96	4
V	$1,2 \times 10^3$	120	4

* Zeitraum (h) zwischen Auslösung einer Fußsohlenreaktion und Tötung

** Anzahl der in der histopathologischen Untersuchung erfaßten Tiere

Tabelle 3: Versuch 86-5/ VI-X

Tiergruppen- nummer	Fußsohleninjektion li. mit <i>S. cholerae suis</i> (Stamm 38-9, lebend) Dosis	$\Delta t(h)^*$	n**
VI	$1,6 \times 10^3$	24	5
VII	$1,6 \times 10^3$	48	4
VIII	$1,6 \times 10^3$	72	4
IX	$1,6 \times 10^3$	96	4
X	$1,6 \times 10^3$	120	4

Tabelle 4: Versuch 86-8

Tiergruppen- nummer	Immunisierung Fußsohle li. mit <i>S. cholerae suis</i> (Stamm 33-13, lebend) Dosis	Injektion Fußsohle re. mit <i>S. cholerae suis</i> (Stamm 38-9)		$\Delta t(h)^*$	n**
		OMP Dosis	lebende Erreger Dosis		
I	10^3	1 µg	-	48	4
II	-	1 µg	-	48	4
III	10^3	-	10^5	48	4
IV	-	-	10^5	48	4

* Zeitraum (h) zwischen Auslösung einer Fußsohlenreaktion und Tötung

** Anzahl der in der histopathologischen Untersuchung erfaßten Tiere

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Histopathologische Untersuchung

Die in 7%igem, gepuffertem Formalin fixierten Hinterfüße wurden durch einen longitudinalen Sagittalschnitt halbiert, routinemäßig im Autotechnikon verarbeitet und in Paraplast (Fa. Monoject Scientific Inc., Irland) mit einem Schmelzpunkt von 55-57°C eingebettet. Von beiden Hinterextremitäten jedes Tieres wurden ca. 5-6 µm dicke Schnitte angefertigt und im Wasserbad auf mit Eiweiß- Glycerin behandelte Objektträger aufgezogen.

Für die histopathologischen Untersuchungen wurden folgende Färbungen verwandt: Hämalaun- Eosin (HE), Toluidinblau, Giemsa.

3.1.1. Semiquantitative Erfassung der entzündlichen Veränderungen

An der Gesamtübersicht sowie in den einzelnen Gewebeschichten des histologischen Präparates wurde mit dem Trockensystem (25-/ 100-/ 400fache Vergrößerung) der flächenmäßige Anteil der zellig- entzündlich veränderten Areale untersucht.

Folgende Gewebeschichten bzw. -strukturen wurden nach Ausmaß und Verteilungsmuster der entzündlichen Infiltrate beurteilt:

Epidermis

Korium

Subkutis

Muskulatur

Knöchernen Strukturen

Gelenkkapsel

Hautanhangsgebilde

Anhand der flächenmäßigen Ausdehnung der entzündlichen Veränderungen im Gesamtschnitt und in den einzelnen Gewebsschichten wurde eine Einteilung in 5 Schweregrade (1+ bis 5+) vorgenommen:

- + = geringgradig
- ++ = gering- bis mittelgradig
- +++ = mittelgradig
- ++++ = mittel- bis hochgradig
- +++++ = hochgradig

3.1.2. Charakterisierung der Entzündungsqualität

Zur näheren Charakterisierung der vorherrschenden Entzündungszellpopulationen wurden pro Gewebeschnitt mindestens 20 Gesichtsfelder im Bereich der entzündlichen Zellinfiltrate bei 1000facher Vergrößerung (Ölimmersion) durchgemustert.

Dabei wurde der relative Anteil der einzelnen Entzündungszellqualitäten anhand einer Abstufung von 1+ bis 10+ semiquantitativ erfaßt.

Die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Auswertung erfolgte durch Wiederholung der histopathologischen Untersuchung in 14- tägigem Abstand.

3.2. Immunhistochemie

Die histologischen Schnitte der Extremitäten sämtlicher Tiere wurden einer immunhistochemischen Untersuchung zur Darstellung der Erreger bzw. des Erregerantigens unterzogen. Die Untersuchung erfolgte an 5-6 µm dicken Paraffinschnitten, die durch Objektträgerbeschichtung mit 0,5%igem Elmers Glue (Fa. Dakopatts GmbH, Hamburg) und Trocknung im Brutschrank über Nacht bei 50°C auf den Objektträgern fixiert wurden.

Grundsätzlich wurde die ABC- Komplex- Methode ange-

wandt. In einem Teil der Fälle erfolgte zu methodischen Vergleichszwecken die Anwendung des PAP-Verfahrens.

3.2.1. ABC- Methode

Es wurde die von Hsu et al. (1981b) beschriebene Avidin- Biotin- Peroxidase- Komplex- Technik angewandt. Zur Durchführung der Methode wurde ein ABC-Kit der Firma Vectastain (über Fa. Camon Labor-service GmbH, Wiesbaden) verwandt, bestehend aus normalem Ziegenserum, biotiniliertem Anti- Kaninchen- IgG und dem ABC- Reagens.

Die Verdünnung sämtlicher verwandten Antiseren erfolgte mit einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS- Lösung, pH 7,2- 7,3).

Die Schnitte wurden mittels Xylol (2 x 5 min) entparaffiniert, die anschließende Rehydrierung erfolgte über eine absteigende Alkoholreihe (je 2 x 5 min 100%-, 96%- und 70%iger Alkohol).

Die folgenden Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer ausgeführt.

Zur Blockierung der im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte mit 1% H_2O_2 in absolutem Methanol (5 min) bedeckt. Anschließend erfolgte ein Waschvorgang in PBS für 10 Minuten.

Danach wurden die Schnitte mit einer 0,1%igen Proteaselösung (Protease Typ XXIV, Fa. Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) behandelt (15 min). Es folgte ein Waschschrift in PBS- Lösung (10 min).

Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen der in der Folge verwandten Antikörper an Gewebsproteine wurden die Schnitte mit Normalserum von der Ziege (Ver-

dünnung 1:70, Inkubationszeit 15 min) inkubiert. Überschüssiges Serum wurde abgetupft.

Das primäre Antiserum stammte aus mit dem *S. cholerae suis*- Stamm 38-9 infizierten Kaninchen und wurde freundlicherweise von Dr. R. L. Wood, National Animal Disease Center des USDA, ARC in Ames, Iowa 50011, USA, zur Verfügung gestellt. Die Verdünnung betrug 1:400, die Inkubationsdauer 20 Minuten. Ungebundener primärer Antikörper wurde mit PBS abgewaschen (15 min).

Zur Herabsetzung der Oberflächenspannung und damit zur besseren Benetzung der Schnitte mit den Antikörperlösungen wurde eine 1%ige Brij- Lösung (Brij 35- Lösung der Fa. Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten, bei einem Wechsel der Brij- Lösung nach 5 Minuten.

Im nächsten Reaktionsschritt erfolgte die Zugabe des sekundären, biotinilierten Antikörpers (biotiniliertes Ziegen- Anti- Kaninchen- IgG) in einer Verdünnung von 1:200. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Anschließend erfolgte das Waschen der Schnitte in PBS (15 min).

Darauf folgend wurden die Schnitte mit dem Avidin-Biotin- Peroxidase- Komplex inkubiert. Das ABC-Reagens wurde ca. 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt. Die Verdünnung betrug 1:100, die Inkubationszeit 30 Minuten. Nicht gebundenes ABC- Reagens wurde vorsichtig mit PBS abgewaschen (15 min).

Als Chromogen wurde eine AEC- Lösung eingesetzt. Dazu wurden 20 mg des AEC (= 3- Amino- 9- Äthylcarbazol)- Farbstoffes (Fa. Sigma Chemie GmbH)

in 12 ml DMSO (Fa. Sigma Chemie GmbH) und 200 ml Michaelispuffer (20,6 g Barbitalnatrium ad 1000 ml Aqua bidest., pH 7,4) gelöst. Die Lösung wurde filtriert (Faltenfilter, Ø 125 mm; Fa. Schleicher und Schuell) und unmittelbar vor Gebrauch mit 10 µl 30%iger H₂O₂-Lösung versetzt. Es wurde 10 Minuten inkubiert und danach mit PBS gespült.

Anschließend wurden die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt (2 min) und unter Verwendung von Kaiser's Glycerin- Gelatine mit einem Deckglas versehen.

3.2.2. PAP- Methode

Es wurde die von Sternberger (1979) beschriebene Peroxidase- Antiperoxidase- Methode angewandt.

Entparaffinierung der Schnitte, Blockierung endogener Peroxidaseaktivität, Proteasebehandlung und sämtliche Waschvorgänge in PBS wurden entsprechend den Angaben bei der ABC- Methode durchgeführt.

Die Verdünnung der Antiseren erfolgte ebenso mit PBS.

Es wurde gleichfalls bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

Zur Blockade unspezifisch- reaktiver Stellen am Gewebeschnitt wurden die Schnitte mit porcinem Normalserum inkubiert (Verdünnung 1:30, Inkubationszeit 15 min). Überschüssiges Serum wurde abgetupft.

Der primäre Antikörper entsprach dem bei der ABC- Methode verwandten Antiserum. Die Verdünnung betrug 1:200, die Inkubationsdauer 20 Minuten.

Die Behandlung der Schnitte mit der 1%igen Brij-Lösung erfolgte auf gleiche Weise wie bei der ABC-Methode.

Als sekundärer Antikörper wurde Schwein-Anti-Kaninchen-Immunserum (Fa. Dakopatts GmbH, Hamburg) verwandt (Verdünnung 1:60, Inkubationszeit 20 min).

Im nächsten Reaktionsschritt erfolgte die Zugabe des Meerrettichperoxidase-Kaninchen-Antiperoxidase (PAP)-Komplexes (Fa. Dakopatts GmbH, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:100 bei 20-minütiger Inkubation.

Die Antigen-Antikörperreaktion wurde entsprechend der ABC-Methode durch Anwendung einer AEC-Lösung sichtbar gemacht.

Es erfolgte ebenso eine Gegenfärbung der Schnitte mit Hämalaun (2 min) und die Eindeckung in Kaiser's Glycerin-Gelatine.

3.2.3. Kontrollansätze

Routinemäßig wurden zur Erkennung unspezifischer Reaktionen folgende Negativkontrollen mitgeführt:

1. Inkubation der Schnitte mit normalem Kaninchen-serum anstelle des primären Antikörpers.
2. Ersatz des primären Antikörpers durch PBS.
3. Identische Behandlung der nicht-Antigen-injizierten Mäusefüße.

Als Positivkontrolle diente routinemäßig fixiertes und in Paraffin eingebettetes Dünndarm- und Mesenteriallymphknotengewebe von Schweinen, die oral mit dem *S. cholerae* suis-Stamm 38-9 infiziert

worden waren (freundlicherweise von Prof. Dr. A. Pospischil, Institut für Veterinärpathologie der Universität Zürich, zur Verfügung gestellt).

3.2.4. Immunhistochemische Befunderhebung

Die dem immunhistochemischen Verfahren zum Nachweis von *S. cholerae suis*- Keimen bzw. - Antigenen unterzogenen Schnitte wurden qualitativ nach Erregerlokalisierung sowie semiquantitativ ausgewertet.

Hierfür wurden 20 Gesichtsfelder im Lichtmikroskop bei 1000facher Vergrößerung (Ölimmersion) durchgemustert und die positiv markierten zellulären Elemente ausgezählt. Extrazellulär liegende, positiv angefärbte Erreger wurden gleichfalls protokolliert.

Die Summe der auf diese Weise pro Gesamtschnitt erfaßten positiv angefärbten Zellen wurden als repräsentatives Maß für die Abschätzung der Erreger- bzw. Antigenquantität gesetzt.

Aus den so erfaßten Daten wurde der Mittelwert für die jeweilige Versuchstiergruppe errechnet.

Die Reproduzierbarkeit der Auswertung wurde durch eine Wiederholung in einem Abstand von 14 Tagen überprüft.

D. ERGEBNISSE

1. Ausmaß und Charakter der histologisch erfaßbaren entzündlichen Reaktion

1.1. Versuch 86-3 (Abbildung 7a; Tabelle 5)

Die Tiere dieser Versuchsgruppen wurden mit 4 unterschiedlichen Dosierungen lebender *S. cholerae* suis-Erreger, Stamm 33-13, durch subkutane Injektion immunisiert. Die Fußsohlenreaktion wurde 30 Tage später durch Injektion von $1,6 \times 10^4$ lebenden Erregern des *S. cholerae* suis-Stammes 38-9 ausgelöst.

Gruppe I: Die Immunisierung der Tiere dieser Gruppe erfolgte mit $1,4 \times 10^6$ lebenden Erregern des Stammes 33-13 (Tab. 1).

48 Stunden nach Fußsohleninjektion zeigt sich bezogen auf die Gesamtübersicht eine mittel- bis hochgradige, vorwiegend granulozytäre entzündliche Reaktion (Abb. 7a). Die Subkutis ist hochgradig, vorherrschend diffus mit Entzündungszellen infiltriert und deutlich ödematisiert; darin sind einzelne, z.T. degranulierte Mastzellen auffindbar. Korium und Muskulatur sind mittelgradig infiltriert (Tab. 5). Bei einzelnen Tieren der Gruppe zeigen Gelenkkapseln und periostale Sehnenansätze eine geringgradige, granulozytäre Infiltration.

Gruppe II: Die Immunisierungsdosis betrug bei dieser Gruppe $1,4 \times 10^5$ lebende Erreger des *S. cholerae* suis-Stammes 33-13 (Tab. 1).

In einem zeitlichen Abstand von 72 Stunden nach Fußsohleninjektion ist im histologischen Schnitt eine mittel- bis hochgradige, überwiegend granulozytäre

und auch histiozytäre Reaktion nachweisbar (Abb. 7a). Nahezu das gesamte subkutane Binde- und Fettgewebe zeigt eine diffuse, vorwiegend eitrige, teils nekrotisierende Entzündung mit eitriger Vaskulitis und Perivaskulitis (Abb. 7a; Tab. 5). Die Muskulatur weist Einzelfasernekrosen bei mittel- bis hochgradiger, betont herdförmiger Entzündungszellinfiltration auf. Das Korium hingegen läßt lediglich eine gering- bis mittelgradige entzündlich- zellige Infiltration erkennen. Korium, Muskulatur und vor allem Subkutis sind deutlich ödematisiert.

Gruppe III: Die Tiere dieser Gruppe wurden mit $1,4 \times 10^3$ Erregern des *S. cholerae suis* Stammes 33-13 immunisiert (Tab. 1).

96 Stunden nach Fußsohleninjektion ist eine hochgradige, histio- granulozytäre Entzündung der Subkutis unter Beteiligung einzelner Lymphozyten mit mittel- bis hochgradiger Infiltration der Muskulatur und Muskelfaseruntergängen nachweisbar. Im Korium zeigen sich nur einzelne gemischtzellige Infiltrate (Abb. 7a; Tab. 5). Bei den Tieren dieser Gruppe ist eine geringgradige granulohistiozytäre Periostitis und eine entsprechende geringgradige Beteiligung der Gelenkkapseln nachweisbar (Tab. 5). Bezogen auf die gesamte Fußsohlenfläche liegen hochgradige Veränderungen vor.

Im Vergleich mit den Gruppen I und II ist die Ausdehnung der histologisch nachweisbaren entzündlichen Veränderungen bei dieser Gruppe maximal. Die Entzündung ist durch das Überwiegen von mononukleären Zellen gekennzeichnet (Abb. 7a).

1

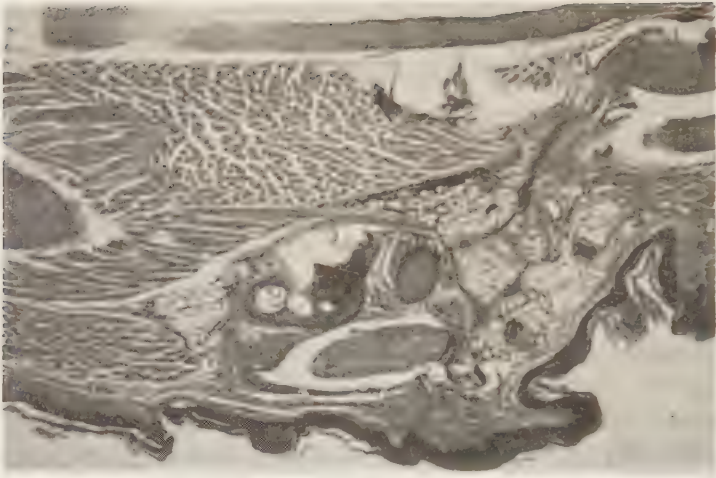


Abb. 1: Fußsohle Maus,
geringgradige entzündliche Reaktion 48 Stunden nach In-
jektion von $1,2 \times 10^7$ lebenden Erregern des *S. cholerae*
suis- Stammes 33-13, keine Vorimmunisierung;
HE- Färbung, Vergrößerung 25x

2

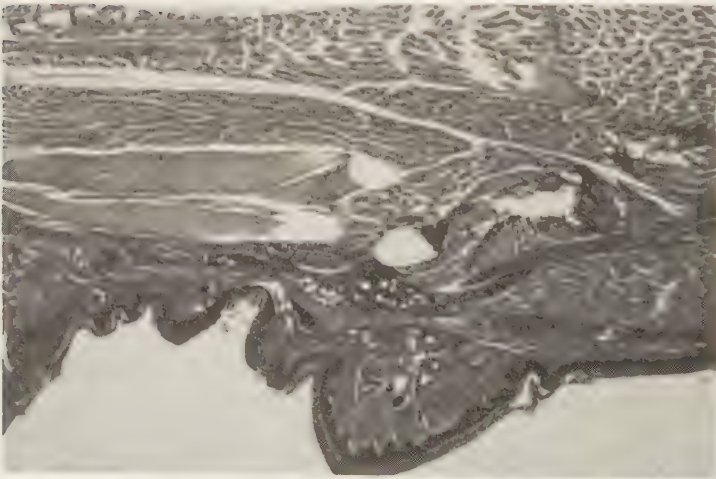


Abb. 2: Fußsohle Maus,
mittelgradige entzündliche Reaktion 120 Stunden nach In-
jektion von $1,2 \times 10^7$ lebenden Erregern des *S. cholerae*
suis- Stammes 33-13, keine Vorimmunisierung;
HE- Färbung, Vergrößerung 25x

3

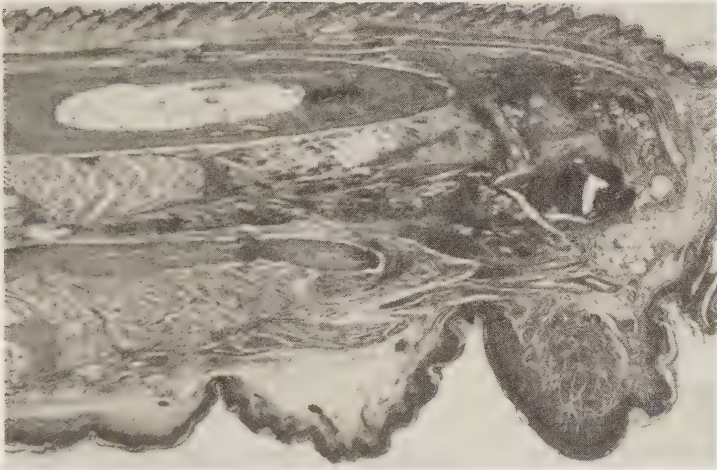


Abb. 3: Übersicht Fuß Maus,
hochgradige entzündliche Reaktion 48 Stunden nach In-
jektion von 10^5 lebenden Erregern des *S. cholerae suis*-
- Stammes 38-9, Immunisierung 30 Tage zuvor mit 10^7 le-
benden Erregern des *S. cholerae suis*- Stammes 33-13;
HE- Färbung, Vergrößerung 5x

Gruppe IV: In dieser Gruppe erfolgte die Immunisierung der Tiere mit $1,4 \times 10^2$ Erregern des Stammes 33-13 (Tab. 1).

In einem Zeitabstand von 96 Stunden nach Fußsohleninjektion zeigt sich eine mittelgradige, größtenteils diffuse, vereinzelt herdförmige, histio-granulozytäre und lymphozytäre Entzündung (Abb. 7a). Die Subkutis zeigt mittel- bis hochgradige entzündliche Veränderungen mit deutlicher Ödematisierung des Gewebes und geringgradiger Perivaskulitis. Die Infiltration der Muskulatur ist mittelgradig; zahlreiche Muskelfaseruntergänge sind nachweisbar. Das Korium ist nahezu unverändert. In Periost und Gelenkkapseln zeigen sich einzelne kleine, zellige Entzündungsherde (Tab. 5).

Die Veränderungen in den als Kontrollen verwandten kontralateralen Fußsohlen sämtlicher Tiere beschränken sich nach Injektion von 0,05 ml phys. NaCl-Lösung auf einzelne, im dezent ödematisierten subkutanen Binde- und Fettgewebe liegende Granulozyten.

Die Untersuchung der verschieden immunisierten und in unterschiedlichen Zeitabständen nach Fußsohleninjektion getöteten Tiere der 4 Versuchsgruppen liefert unterschiedliche histopathologische Befunde.

Die Tiere der Gruppen I und II (Immunisierung mit $1,4 \times 10^6$ bzw. $1,4 \times 10^5$ Erregern des Stammes 33-13) zeigen 2 bzw. 3 Tage nach Fußsohleninjektion eine starke, vor allem granulozytäre Reaktion. Eine noch stärkere entzündliche Reaktion, allerdings mit Vorherrschen histio- lymphozytärer Zellen, ist am 4. Tag nach Injektion bei den mit $1,4 \times 10^3$ Erregern immunisierten Tiere der Gruppe III festzustellen.

Qualitativ gleichartig, jedoch geringeren Grades ist die entzündliche Reaktion in den Fußsohlen der mit $1,4 \times 10^2$ Keimen immunisierten Tiere der Gruppe IV am 4. Tag post infectionem.

Tabelle 5: Versuch 86-3

Versuchstiergruppe	I	II	III	IV
Epidermis	-	-	-	-
Korium	+++	++	+	-
Subkutis	+++++	+++++	+++++	+++++
Muskulatur	+++	++++	++++	+++
Knöcherne Strukturen	+*	-	+	+
Gelenkkapsel	+*	-	+	+
Hautanhangsgebilde	-	-	-	-
$\Delta t(h)$	48	72	96	96

Tabelle 5: Ausmaß der entzündlichen Veränderungen in den einzelnen Gewebeschichten (1+ bis 5+)

Immunisierung: I : $1,4 \times 10^6$ lebende *S. cholerae* suis 33-13
 II : $1,4 \times 10^5$ lebende *S. cholerae* suis 33-13
 III: $1,4 \times 10^3$ lebende *S. cholerae* suis 33-13
 IV : $1,4 \times 10^2$ lebende *S. cholerae* suis 33-13

Fußsohleninjektion, 30 Tage nach Immunisierung:

I-IV : $1,6 \times 10^4$ lebende *S. cholerae* suis 38-9

$\Delta t(h)$: Zeitraum zwischen Fußsohleninjektion und Tötung in Stunden

* nur bei einzelnen Tieren der Versuchsgruppe

1.2. Versuch 86-5/ I-V (Abbildung 8a; Tabelle 6)

Sämtliche Mäuse dieses Versuches wurden mit $1,2 \times 10^3$ Erregern des avirulenten *S. cholerae suis*-Stammes 33-13 in 0,05 ml phys. NaCl-Lösung in die linke hintere Fußsohle injiziert (Tab. 2) und in verschiedenen Zeitabständen getötet. Es erfolgte keine Vorimmunisierung.

Gruppe I (Reaktion nach 24 Stunden): Die histopathologische Untersuchung zeigt eine insgesamt geringgradige, vor allem perivaskuläre Infiltration des Gewebes überwiegend mit neutrophilen Granulozyten (Abb. 8a). Daneben treten zahlreiche, teils degranulierte Mastzellen auf. Die Veränderungen beschränken sich auf die Subkutis, die außerdem dezent ödematisiert ist; einzelne Entzündungszellen sind in den Bindegewebssepten der Muskulatur zu finden, das Korium und die übrigen Gewebestrukturen sind unverändert (Tab. 6).

Gruppe II (Reaktion nach 48 Stunden): Im histologischen Schnitt ist auch zu diesem Zeitpunkt nur eine geringgradige, betont perivaskuläre, z. T. auch diffuse entzündlich-zellige Infiltration der Subkutis mit Vorherrschen polymorphkerniger Granulozyten bei mäßiger Ödematisierung nachweisbar (Abb. 1 u. 8a). Die Muskulatur zeigt lediglich einzelne dezente Infiltrate mit neutrophilen Granulozyten. Die übrigen Gewebeschichten sind unverändert (Tab. 6).

Gruppe III (Reaktion nach 72 Stunden): Die Fußsohlen der Mäuse zeigen etwas stärkere entzündliche Veränderungen, die insgesamt noch als geringgradig einzustufen sind. Der Charakter des entzündlichen Zellinfiltrates ist nicht mehr vorherrschend granulo-

zytär, sondern granulo- histiozytär mit Beteiligung einzelner Lymphozyten (Abb. 8a). Die Veränderungen beschränken sich auch 72 Stunden nach Injektion weitgehend auf die Subkutis, die neben der entzündlichen Zellinfiltration eine leichte Ödematisierung zeigt. Vereinzelte kleinere, herdförmig- gemischt- zellige Infiltrate sind neben einzelnen Fasernekrosen in der Muskulatur nachzuweisen. Alle übrigen Gewebeschichten sind ohne besonderen Befund (Tab. 6).

Gruppe IV (Reaktion nach 96 Stunden): Die entzündliche Infiltration nimmt zu. Bezogen auf die Gesamtfläche der Fußsohle ist sie gering- bis mittelgradig, wobei sich die Zellpopulation wie bei Gruppe III aus Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten zusammensetzt; einzelne Mastzellen sind nachweisbar. Es überwiegen die mononukleären Zellen (Abb. 8a). Die entzündlich- zellige Infiltration und geringgradige Ödematisierung beschränkt sich maßgeblich auf das subkutane Binde- und Fettgewebe, das insgesamt mittelgradig verändert ist. In der Muskulatur finden sich einzelne histio- granulozytäre Herde mit vereinzelt Muskelfaseruntergängen. Die weiteren beurteilten Gewebestrukturen sind unauffällig (Tab. 6).

Gruppe V (Reaktion nach 120 Stunden): Innerhalb des Versuches 86-5 zeigen die Tiere dieser Gruppe die stärksten entzündlichen Veränderungen. Die Infiltration mit Entzündungszellen ist mittelgradig, bei Vorherrschen mononukleärer Elemente. Der Makrophage ist der häufigste Zelltyp (Abb. 2 u. 8a). Auch bei den Tieren dieser Gruppe ist vor allem die Subkutis betroffen, wobei die entzündlich- zellige Infiltration diffus und herdförmig ist. Darüberhinaus weisen Korium und Muskulatur geringgradige, vorwiegend

mononukleäre Zellinfiltrate auf. In den histologischen Schnitten zweier Tiere sind einzelne Histiozyten und neutrophile Granulozyten im Periost nachzuweisen.

Die kontralateralen Kontrollfüße sämtlicher in diesem Versuch eingesetzten Mäuse zeigen nach Injektion von 0,05 ml phys. NaCl- Lösung lediglich eine dezente Ödematisierung und neben verstreut liegenden Mastzellen einzelne perivaskulär auftretende polymorphkernige Granulozyten.

Tabelle 6: Versuch 86-5/ I-V

Versuchstiergruppe	I	II	III	IV	V
Epidermis	-	-	-	-	-
Korium	-	-	-	-	-
Subkutis	++	++	+++	+++	+++
Muskulatur	-	-	+	+	+
Knöcherne Strukturen	-	-	-	-	+ *
Gelenkkapsel	-	-	-	-	-
Hautanhangsgebilde	-	-	-	-	-
$\Delta t(h)$	24	48	72	96	120

Tabelle 6: Ausmaß der entzündlichen Veränderungen in den einzelnen Gewebeschichten (1+ bis 5+)

Immunisierung: keine

Fußsohleninjektion: $1,2 \times 10^3$ lebende *S. cholerae* suis 33-13

$\Delta t(h)$: Zeitraum zwischen Fußsohleninjektion und Tötung in Stunden

* nur bei einzelnen Tieren der Versuchsgruppe

1.3. Versuch 86-5/ VI-X (Abbildung 9a; Tabelle 7)

Sämtlichen Mäusen der Gruppen VI bis X des Versuches 86-5 wurde eine Injektion von $1,6 \times 10^3$ lebenden Keimen des virulenten *S. cholerae suis*- Stammes 38-9 in 0,05 ml phys. NaCl- Lösung in die linke hintere Fußsohle verabreicht (Tab. 3). Eine Vorimmunisierung erfolgte nicht.

Gruppe VI (Reaktion nach 24 Stunden): Bis auf eine dezente Ödematisierung und einzelne Granulozyten und Makrophagen im subkutanen Binde- und Fettgewebe und in den bindegewebigen Septen der Muskulatur sind keine entzündlichen Veränderungen in den Gewebestrukturen der Fußsohlen nachweisbar (Abb. 9a; Tab. 7).

Gruppe VII (Reaktion nach 48 Stunden): Es ist eine geringgradige, vorwiegend granulozytäre Infiltration und dezente Ödematisierung der Gefäßwände, des perivaskulären und übrigen lockeren Bindegewebes der Subkutis mit Auftreten einzelner Mastzellen zu verzeichnen (Abb. 9a). Die übrigen Gewebeschichten weisen keine Veränderungen auf (Tab. 7).

Gruppe VIII (Reaktion nach 72 Stunden): Die entzündlich- zellige Infiltration ist etwas stärker, aber im Durchschnitt der untersuchten Tiere immer noch als geringgradig zu bezeichnen. Die Entzündungszellpopulation setzt sich überwiegend aus Granulozyten zusammen (Abb. 9a). Neben der vorherrschend diffusen und teilweise herdförmigen Infiltration der Subkutis treten in den Bindegewebssepten der Muskulatur geringgradig kleine Herde auf, die sich aus neutrophilen Granulozyten und Histiozyten zusammensetzen. Die Ödematisierung des subkutanen

Binde- und Fettgewebes und des interstitiellen Gewebes der Muskulatur ist geringgradig.

Gruppe IX (Reaktion nach 96 Stunden): Im Gesamtschnitt sind entzündliche Reaktion und Ödematisierung gering- bis mittelgradig. Der Charakter der Zellinfiltrate ist zu gleichen Teilen mononukleär und granulozytär (Abb. 9a). Neben einer mittelgradigen diffusen Durchsetzung der Subkutis mit Entzündungszellen zeichnet sich die Muskulatur durch das Vorhandensein mehrerer gemischtzelliger Herde mit dezentem Muskelfaseruntergang aus (Tab. 7).

Gruppe X (Reaktion nach 120 Stunden): Es ist keine stärkere entzündliche Reaktion als nach 96 Stunden zu bemerken. Die gering- bis mittelgradigen Veränderungen sind durch das Vorherrschen mononukleärer Zellen charakterisiert (Abb. 9a). Wiederum ist vorwiegend das subkutane Binde- und Fettgewebe betroffen. Die Entzündungszellinfiltrate in der Muskulatur sind geringgradiger als bei den nach 96 Stunden getöteten Tieren der Gruppe IV. Dafür ist bei den Tieren der Gruppe V eine geringgradige diffuse gemischtzellige Infiltration des Koriums zu verzeichnen (Tab. 7).

Die histopathologische Untersuchung der kontralateralen, nicht- Antigen- injizierten Fußsohlen sämtlicher in diesem Versuch zusammengefaßter Mäuse zeigt lediglich eine dezente gemischtzellige Infiltration und Ödematisierung des subkutanen Binde- und Fettgewebes.

Tabelle 7: Versuch 86-5/ VI-X

Versuchstiergruppe	VI	VII	VIII	IX	X
Epidermis	-	-	-	-	-
Korium	-	-	-	-	+
Subkutis	-	+	+++	+++	+++
Muskulatur	-	-	+	++	+
Knöcherne Strukturen	-	-	-	-	-
Gelenkkapsel	-	-	-	-	-
Hautanhangsgebilde	-	-	-	-	-
$\Delta t(h)$	24	48	72	96	120

Tabelle 7: Ausmaß der entzündlichen Veränderungen in den einzelnen Gewebeschichten (1+ bis 5+)

Immunisierung: keine

Fußsohleninjektion: $1,6 \times 10^3$ lebende *S. cholerae* suis 38-9

$\Delta t(h)$: Zeitraum zwischen Fußsohleninjektion und Tötung in Stunden

1.4. Versuch 86-8 (Abbildung 10a; Tabelle 8)

Den Mäusen der Gruppen I und II wurde eine Injektion von 1 µg OMP des virulenten *S. cholerae* suis-Stammes 38-9 in 0,05 ml phys. NaCl- Lösung in die linke hintere Fußsohle verabreicht.

Zeitgleich wurden den Tieren der Gruppen III und IV 10^5 lebende Keime des *S. cholerae* suis-Stammes 38-9 in 0,05 ml phys. NaCl- Lösung ebenfalls in die linke hintere Fußsohle injiziert.

30 Tage zuvor erfolgte eine Immunisierung der Tiere der Gruppen I und III mit 10^3 Erregern des avirulenten *S. cholerae* suis-Stammes 33-13, die Gruppen II und IV wurden nicht immunisiert (Tab. 4).

Aus den 4 Versuchsgruppen wurden 48 Stunden nach Fußsohleninjektion je 4 Tiere zur Durchführung der histopathologischen Untersuchung getötet.

Gruppe I: 48 Stunden nach Injektion des OMP- Extraktes des Stammes 38-9 zeigt sich eine deutliche, mittelgradige entzündliche Infiltration bei Vorherrschen mononukleärer Zellelemente (Abb. 10a). Das subkutane Binde- und Fettgewebe ist hochgradig diffus mit Entzündungszellen durchsetzt und gering- bis mittelgradig ödematisiert, daneben treten perivaskuläre, herdförmige Zellansammlungen auf. Ausgehend von der Subkutis ist eine mittelgradige entzündlich-zellige Infiltration der bindegewebigen Septen der Muskelschicht mit Zerstörung zahlreicher Muskelfasern nachweisbar. Einzelne perivaskuläre, histiоgranulozytäre Infiltrate weist das Korium auf (Tab. 8). Die übrigen Gewebeschichten sind unverändert.

Gruppe II: Die histologischen Präparate der nicht immunisierten Mäuse weisen 48 Stunden nach OMP-

Injektion lediglich geringgradige entzündliche Veränderungen auf, die Zellpopulation setzt sich überwiegend aus mononukleären Zellen zusammen (Abb. 10a). Neben der deutlichen, diffusen Infiltration der Subkutis sind einzelne Entzündungszellherde im perivaskulären Gewebe des Koriums zu sehen. Die Muskulatur ist in das Entzündungsgeschehen nicht einbezogen (Tab. 8). Die Ödematisierung des Fußsohlengewebes ist geringgradig.

Gruppe III: Die mit 10^3 Erregern des avirulenten *S. cholerae suis*- Stammes 33-13 immunisierten Tiere zeigen 2 Tage nach Injektion von 10^5 Erregern des virulenten Stammes 38-9 die stärksten entzündlichen Veränderungen verglichen mit allen untersuchten Tieren sämtlicher anderer Versuchsgruppen. Die gesamte Subkutis ist überwiegend eitrig- phlegmonös und nekrotisierend entzündet, mit mehreren großen Granulozytenherden, umfangreichen Bindegewebsfasernekrosen und hochgradiger Ödematisierung. Zahlreiche Gefäßwände sind entzündlich- zellig infiltriert. Auch die ausgedehnte Fasernekrosen zeigende Muskulatur ist hochgradig mit Entzündungszellen, vorwiegend neutrophilen Granulozyten, durchsetzt. Das Korium ist mittel- bis hochgradig granulozytär und histiolympheozytär infiltriert; daneben sind einige Mastzellen auffindbar. Wie die Muskulatur, ist auch das Korium hochgradig ödematisiert. Einzelne Granulozyten sind in Periost und Gelenkkapseln nachweisbar (Abb. 3 u. 10a; Tab. 8).

Gruppe IV: Die Fußsohlen der Tiere dieser Gruppe zeichnen sich 48 Stunden post applicationem (10^5 Erreger des virulenten Stammes 38-9) durch das Auftreten einer mittel- bis hochgradigen Entzündungsreaktion aus. Die Zellpopulation setzt sich aus neu-

trophilen Granulozyten, Makrophagen und einzelnen Lymphozyten zusammen, wobei die Granulozyten überwiegen (Abb. 10a). Die hochgradige, überwiegend eitrig-phlegmonöse Entzündung und Ödematisierung der Subkutis steht im Vordergrund. Die entzündlich-zellige Infiltration der Muskulatur erreicht ein mittel- bis hochgradiges Ausmaß und ist zu gleichen Teilen diffus und herdförmig. Daneben finden sich mittelgradige Veränderungen im Korium, wobei das Gewebe diffus mit Granulozyten infiltriert ist (Tab. 8). Die knöchernen Strukturen weisen eine dezente, betont granulozytäre Periostitis auf.

Die als Kontrolle dienenden kontralateralen Füße der Mäuse zeigen dezente entzündliche Veränderungen, wie sie bei Versuch 86-3 beschrieben sind.

Tabelle 8: Versuch 86-8

Versuchstiergruppe	I	II	III	IV
Epidermis	-	-	-	-
Korium	+	+	++++	+++
Subkutis	+++++	++++	+++++	+++++
Muskulatur	++++	-	+++++	++++
Knöchernen Strukturen	-	-	+	+
Gelenkkapsel	-	-	+	-
Hautanhangsgebilde	-	-	-	-
$\Delta t(h)$	48	48	48	48

Tabelle 8: Ausmaß der entzündlichen Veränderungen in den einzelnen Gewebeschichten (1+ bis 5+)

Immunisierung: I : 10^3 lebende *S. cholerae* suis 33-13
 II : keine
 III: 10^3 lebende *S. cholerae* suis 33-13
 IV : keine

Fußsohleninjektion, 30 Tage nach Immunisierung (I, III) bzw. ohne Vorimmunisierung:(II, IV):

I : 1 µg OMP 38-9
 II : 1 µg OMP 38-9
 III: 10^5 lebende *S. cholerae* suis 38-9
 IV : 10^5 lebende *S. cholerae* suis 38-9

$\Delta t(h)$: Zeitraum zwischen Fußsohleninjektion und Tötung in Stunden

2. Immunhistochemie (Abbildung 4, 5 u. 6)

2.1. Nachweisbarkeit von Salmonellen und Salmonellenantigen mit immunhistochemischen Methoden

Es gelingt der Nachweis sowohl intakter Erreger der *S. cholerae* suis- Stämme 38-9 und 33-13 (Versuch 86-5/ I-X) als auch des Erregerantigens in Form des OMP von *S. cholerae* suis- Stamm 38-9 (Versuch 86-8) mittels der ABC- Technik.

Mit dem verwandten, durch Immunisierung von Kaninchen mit dem *S. cholerae* suis- Stamm 38-9 gewonnenen Antiserum, lassen sich sowohl Erreger des Stammes 38-9 als auch des Stammes 33-13 immunhistochemisch darstellen. Hinsichtlich der Intensität der Reaktion ergeben sich für beide Stämme nahezu keine Unterschiede.

2.2. Vergleich der Eignung von ABC- und PAP- Methode für den Erregernachweis

Die Anwendung beider immunhistochemischer Methoden an Serienparaffinschnitten zeigt die Überlegenheit des ABC- Verfahrens.

Die ABC- Technik ermöglicht im Vergleich zur PAP- Methode die Verwendung höherer Antiserum- Verdünnungen bei gleichzeitig intensiverer Farbreaktion. Darüber hinaus zeigt sich eine geringere unspezifische Hintergrundanfärbung mit besserer Kontrastierung der Schnitte.

Nachteilig erweist sich bei der ABC- Methode die unspezifische Reaktion von Mastzellgranula. Durch eine Verwendung der ABC- Lösung in basischem Milieu (pH 9,4) läßt sich diese unspezifische Mastzellanfärbung nicht unterdrücken; auch eine Inkubation der Schnitte mit normalem Kaninchenserum anstelle

des primären Antikörpers bzw. der Ersatz des primären Antikörpers durch PBS führt zu keinem Erfolg. Werden die Schnitte lediglich mit dem AEC- Farbstoff inkubiert, färben sich die Mastzellgranula nicht an.

2.3. Immunhistochemisch darstellbare Erregerlokalisation

Salmonellen bzw. Salmonellenantigen sind in den Paraffinschnitten vorwiegend im Zytoplasma von Makrophagen nachweisbar. Die Erreger stellen sich als feinstaubige oder diffuse orange-rote Färbung des Zytoplasmas dar (Abb. 4 u. 5). Vereinzelt sind kleine, extrazellulär liegende Bakterienkolonien nachweisbar, diese sind allerdings schwer von einer gewissen unspezifischen Gewebeanfärbung zu unterscheiden.

Eine Abgrenzung der markierten, erregerhaltigen Makrophagen von unspezifisch angefärbten Mastzellen ist mit Hilfe der Kernform, des Chromatingehaltes des Kernes und der Kern- Zytoplasma- Relation möglich (Abb. 4, 5 u. 6). Daneben stellen sich die Mastzellgranula als intensiver angefärbte und grobgranuläre Strukturen dar, wodurch ein weiteres Differenzierungskriterium gegeben ist (Abb. 6).

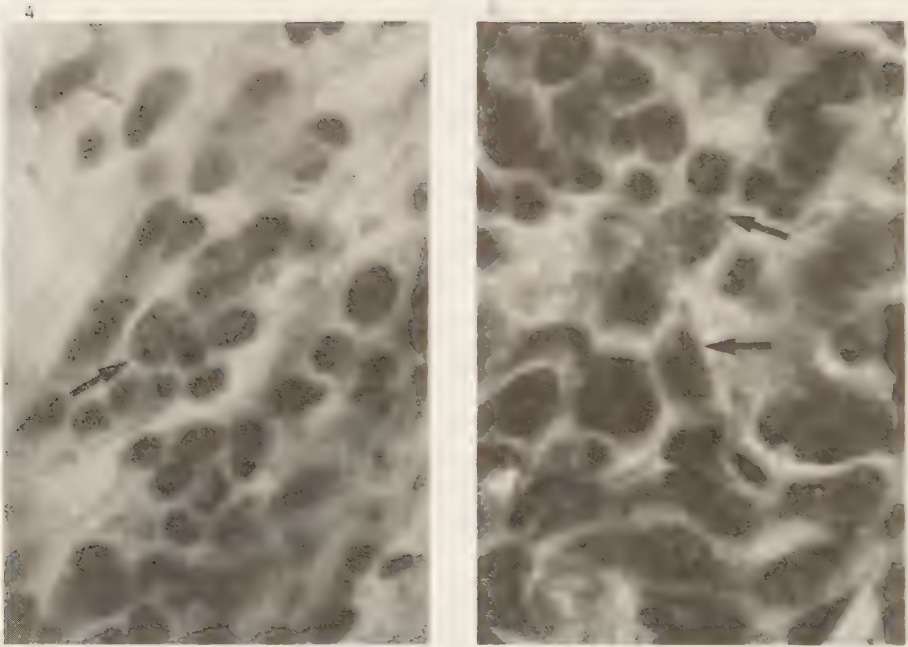


Abb. 4 und 5: Positive cytoplasmatische Markierung von Makrophagen (→)
im Gewebeverband, mit *S. cholerae suis*- Antiserum;
ABC- Technik, Vergrößerung 1000x

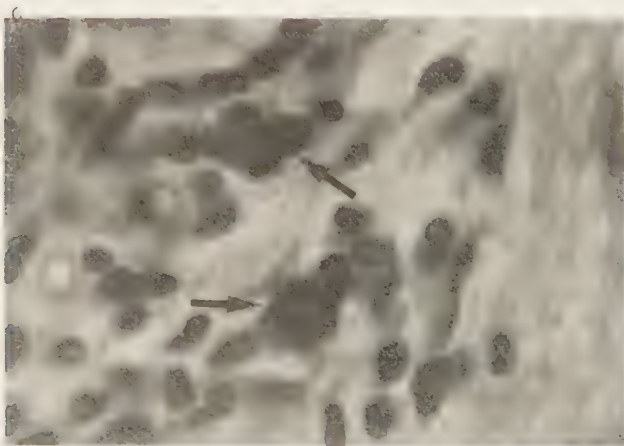


Abb. 6: Unspezifische Anfärbung von Mastzellgranula (→);
ABC- Technik, Vergrößerung 1000x

3. Beziehung zwischen histopathologischem Befund, Fußsohlenschwellung und semiquantitativem, immunhistochemischem Erreger- Antigennachweis

3.1. Versuch 86-3 (Abbildung 7a - c; Tabelle 5)

Ausmaß und Qualität der entzündlichen Reaktion. Meßwerte der Fußsohlenschwellung und Ergebnis der semiquantitativen Auswertung des immunhistochemischen Erregernachweises sind in Abbildung 7a - c graphisch dargestellt.

Die Meßwerte der Fußsohlenschwellung wurden dankenswerterweise von Prof. T.T. Kramer (Head of Department Microbiology and Preventive Medicine, School of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa 50011, USA) zur Verfügung gestellt.

Bei den mit $1,4 \times 10^2$ Erregern des avirulenten *S. cholerae suis*- Stammes 33-13 geimpften Mäusen der Gruppe IV zeigen sich 96 Stunden nach Fußsohleninjektion (Tab. 1) mittelgradige entzündliche Veränderungen mit Vorherrschen histio- lymphozytärer Zellen; der mittlere Meßwert der Fußsohlenschwellung liegt bei $5,4 \times 10^{-1}$ mm. Immunhistochemisch läßt sich innerhalb der 4 Versuchsgruppen hier die größte Anzahl erregerhaltiger Makrophagen nachweisen.

Für die mit $1,4 \times 10^3$ lebenden *S. cholerae suis*- Keimen (Stamm 33-13) immunisierten Tiere der Gruppe III sind 96 Stunden nach Injektion in die Fußsohle (Tab. 1) hochgradige, betont histio- lymphozytäre entzündliche Veränderungen festzustellen. Es ergibt sich eine geringe Anzahl von mit der ABC-Methode darstellbaren erregerhaltigen Makrophagen. Die Messung der Fußsohlenschwellung liefert mit $4,5 \times 10^{-1}$ mm einen niedrigeren Mittelwert als bei Gruppe IV.

Die histopathologische Untersuchung der mit

$1,4 \times 10^5$ Keimen des *S. cholerae suis*- Stammes 33-13 geimpften Mäuse der Gruppe II erbringt 72 Stunden nach Fußsohleninjektion eine mittel- bis hochgradige, vor allem granulozytäre Entzündung; die Auszählung der mit der ABC- Methode positiv angefärbten Makrophagen liefert einen mittleren Wert. Es ergab sich bei den Tieren dieser Gruppe im Mittel eine sehr starke Fußsohlenschwellung ($8,9 \times 10^{-1}$ mm).

Die histologischen Schnitte der Tiere der Gruppe I (Immunisierung mit $1,4 \times 10^6$ Keimen des *S. cholerae suis*- Stammes 33-13) zeigt 48 Stunden nach Injektion in die Fußsohle (Tab. 1) mittel- bis hochgradige entzündliche Veränderungen mit Vorherrschen von polymorphkernigen Granulozyten und eine geringere Anzahl positiv markierter Makrophagen als bei Gruppe II und IV. Der mittlere Meßwert für die Fußsohlenschwellung liegt bei den Tieren dieser Gruppe bei $5,6 \times 10^{-1}$ mm.

Abbildung 7a - c/ 86-3

Immunisierung: I' : $1,4 \times 10^6$ lebende *S. cholerae suis* 33-13

II : $1,4 \times 10^5$ lebende *S. cholerae suis* 33-13

III: $1,4 \times 10^3$ lebende *S. cholerae suis* 33-13

IV : $1,4 \times 10^2$ lebende *S. cholerae suis* 33-13

Fußsohleninjektion: I-IV: $1,6 \times 10^4$ lebende *S. cholerae suis* 38-9

I(n)

I Gruppenbezeichnung

(n) Anzahl der Tiere pro Gruppe

Abb. 7a: Ausmaß der entzündlichen Veränderungen und relativer Anteil der verschiedenen Zellpopulationen am entzündlichen Zellinfiltrat in verschiedenen Zeitabständen nach Fußsohleninjektion

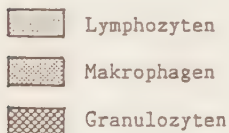
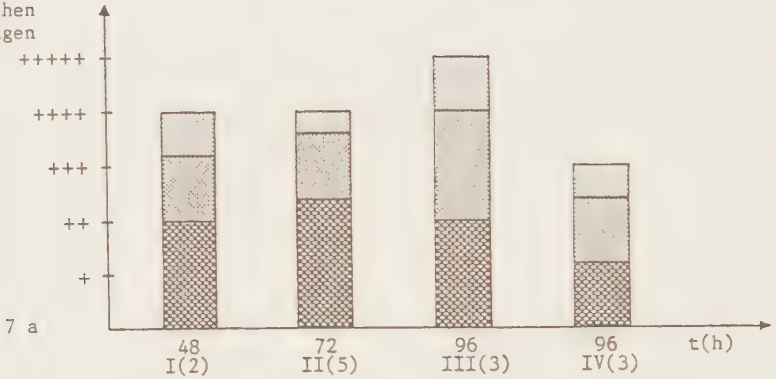


Abb. 7b: Stärke der Fußsohlenschwellung, gemessen in verschiedenen Zeitabständen nach Fußsohleninjektion

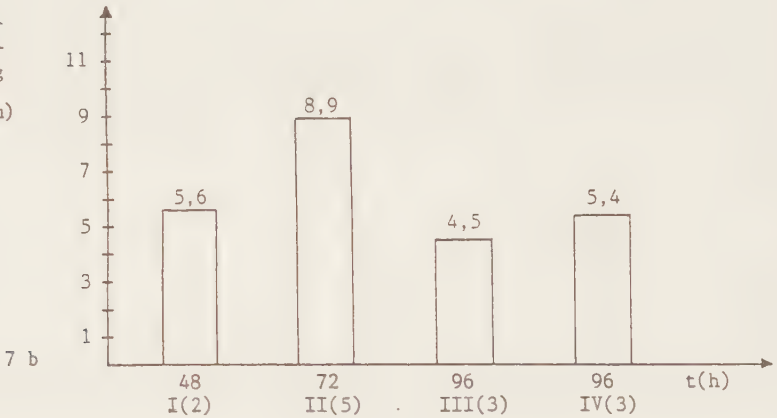
Abb. 7c: Gruppen- Mittelwert der durch *S. cholerae suis*- Antiserum mit der ABC- Methode positiv dargestellten Zellen pro Schnitt

Abb. 7 a - c / Versuch 86 - 3

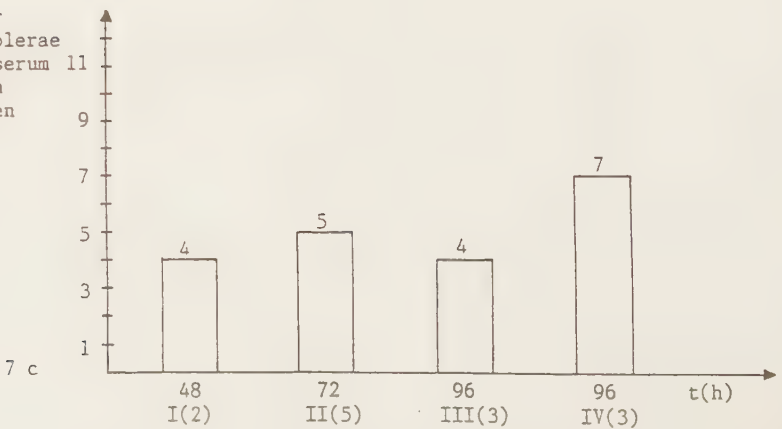
Ausmaß der
entzündlichen
Veränderungen



Stärke der
Fußsohlen-
schwellung
($\times 10^{-1}$ mm)



Anzahl der
mit *S. cholerae*
suis-Antiserum
markierten
Makrophagen



3.2. Versuch 86-5/ I-V (Abbildung 8a - c; Tabelle 6)

In Abbildung 8a - c sind Ausmaß und Qualität der entzündlichen Veränderungen, Messungen der Fußsohlenschwellung und Ergebnisse des immunhistochemischen Erregernachweises graphisch dargestellt.

Die entzündlichen Veränderungen in den untersuchten Mäusefüßen sind 24 bis 72 Stunden nach Injektion von $1,2 \times 10^3$ *S. cholerae suis*- Keimen (Stamm 33-13) (Tab. 2) geringgradig. Bis zu 48 Stunden nach Erregerinjektion überwiegt eine granulozytäre Infiltration, nach 72 Stunden treten mononukleäre Zellen in den Vordergrund. Die Messung der Fußsohlendicke lieferte bis 72 Stunden nach Injektion sehr geringe, leicht ansteigende Werte ($0,9$ bis $1,4 \times 10^{-1}$ mm); mit Hilfe der ABC- Methode sind nur einzelne, positiv markierte, erregerhaltige Makrophagen nachweisbar.

Nach 96 Stunden nimmt das Ausmaß der entzündlichen histio- lymphozytären Infiltration leicht zu und erreicht nach 120 Stunden mittelgradige Werte. Auch die Messung der Fußsohlenschwellung ergibt 96 Stunden post applicationem einen gesteigerten Wert von $2,1 \times 10^{-1}$ mm. Für die Messung nach 120 Stunden liegt der gleiche Wert vor. Die Anzahl der immunhistochemisch positiv markierten Makrophagen nimmt 96 Stunden post injectionem geringgradig zu und erreicht nach 120 Stunden ihr Maximum.

Abbildung 8a - c/ 86-5/ I-V

Immunisierung: -

Fußsohleninjektion: I-V: $1,2 \times 10^3$ lebende *S. cholerae suis* 33-13

I(n)

I Gruppenbezeichnung

(n) Anzahl der Tiere pro Gruppe

Abb. 8a: Ausmaß der entzündlichen Veränderungen und relativer Anteil der verschiedenen Zellpopulationen am entzündlichen Zellinfiltrat in verschiedenen Zeitabständen nach Fußsohleninjektion

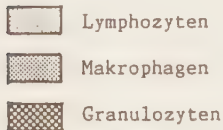
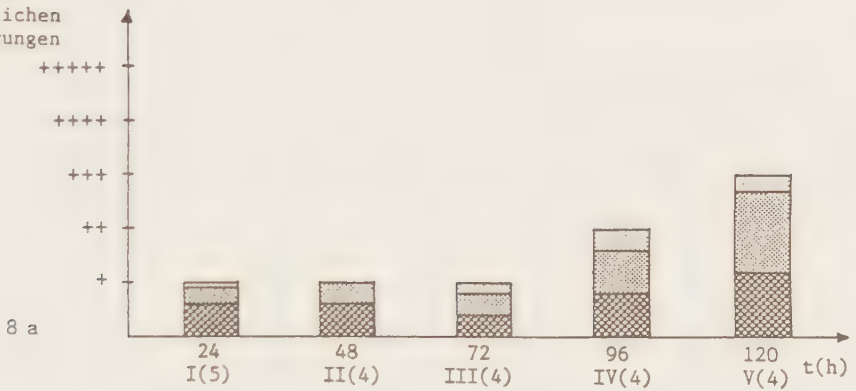


Abb. 8b: Stärke der Fußsohlenschwellung, gemessen in verschiedenen Zeitabständen nach Fußsohleninjektion

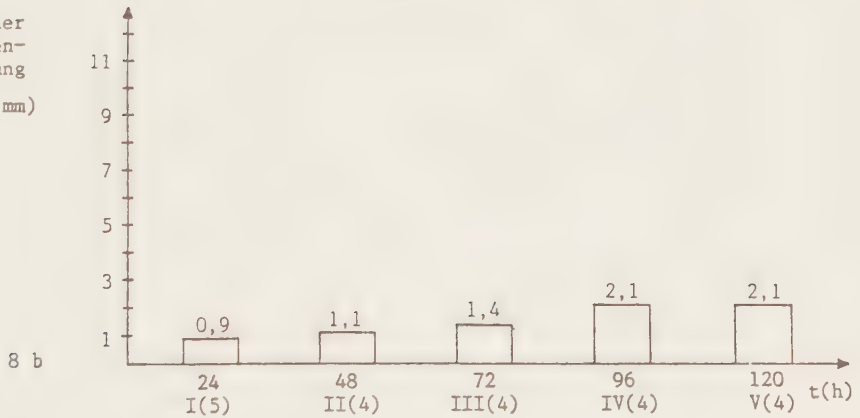
Abb. 8c: Gruppen- Mittelwert der durch *S. cholerae suis*- Antiserum mit der ABC- Methode positiv dargestellten Zellen pro Schnitt

Abb. 8 a - c / Versuch 86 - 5 / I - V

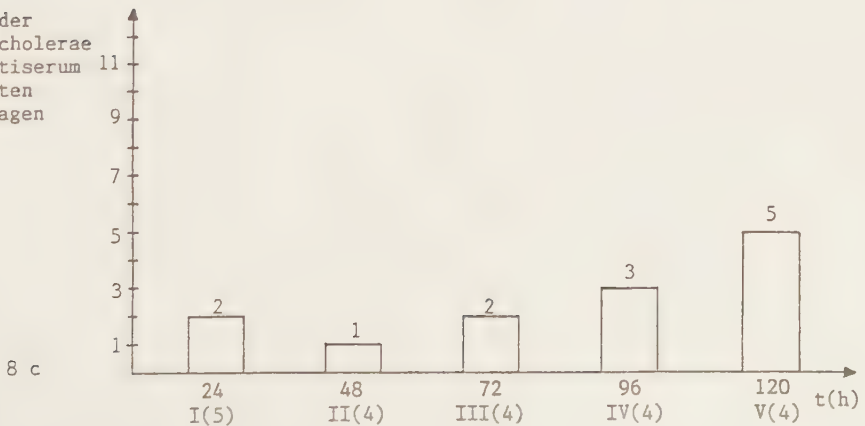
Ausmaß der
entzündlichen
Veränderungen



Stärke der
Fußsohlen-
schwellung
($\times 10^{-1}$ mm)



Anzahl der
mit *S. cholerae*
suis-Antiserum
markierten
Makrophagen



3.3. Versuch 86-5/ VI-X (Abbildung 9a - c;
Tabelle 7)

Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 9a - c graphisch dargestellt.

24 Stunden nach Erregerinjektion ($1,6 \times 10^3$ Keime des Stammes 38-9) sind im Rahmen der histopathologischen Untersuchung der Mäusefüße nahezu keine nennenswerten entzündlichen Veränderungen nachweisbar. Ab 48 Stunden post applicationem tritt eine geringgradige, vorwiegend granulozytäre Reaktion auf. Die Messung der Fußsohlenschwellung liefert 24 und 48 Stunden nach Injektion einen Mittelwert von $0,8 \times 10^{-1}$ mm. Erst nach 48 Stunden sind einzelne erregerhaltige Makrophagen immunhistochemisch nachweisbar.

72 Stunden post injectionem ist die entzündliche Zellinfiltration nach wie vor geringgradig, mit Vorherrschen der granulozytären Elemente. Der Mittelwert für die Messung der Fußsohlenschwellung steigt auf $1,6 \times 10^{-1}$ mm. Die Anzahl mit der ABC- Methode positiv markierter Makrophagen nimmt leicht zu.

Nach 96 Stunden erreicht das jetzt vorherrschend mononukleäre, entzündliche Zellinfiltrat sein relatives Maximum und bleibt in gering- bis mittelgradigem Ausmaß für weitere 24 Stunden erhalten. Korrespondierend hierzu liegt 96 Stunden nach Injektion der höchste Meßwert der Fußsohlenschwellung vor ($2,2 \times 10^{-1}$ mm), während nach weiteren 24 Stunden eine Abnahme der Fußsohlendicke zu verzeichnen ist ($1,5 \times 10^{-1}$ mm). Bezüglich der Anzahl positiv markierter Makrophagen zeigt sich nach 96 Stunden eine geringgradige Zunahme, während 120 Stunden nach Erregerinjektion wieder weniger Salmonellen- enthaltende Makrophagen mit der ABC- Methode nachweisbar sind.

Bei einem Teil der Tiere sämtlicher Versuchsgruppen sind vereinzelt extrazellulär liegende Bakterienkolonien auffindbar.

Abbildung 9a - c/ 86-5/ V-X

Immunisierung: -

Fußsohleninjektion: V-X: $1,6 \times 10^3$ lebende *S. cholerae* suis 38-9

I(n)

I Gruppenbezeichnung

(n) Anzahl der Tiere pro Gruppe

Abb. 9a: Ausmaß der entzündlichen Veränderungen und relativer Anteil der verschiedenen Zellpopulationen am entzündlichen Zellinfiltrat in verschiedenen Zeitabständen nach Fußsohleninjektion

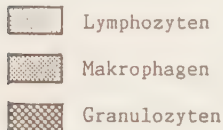
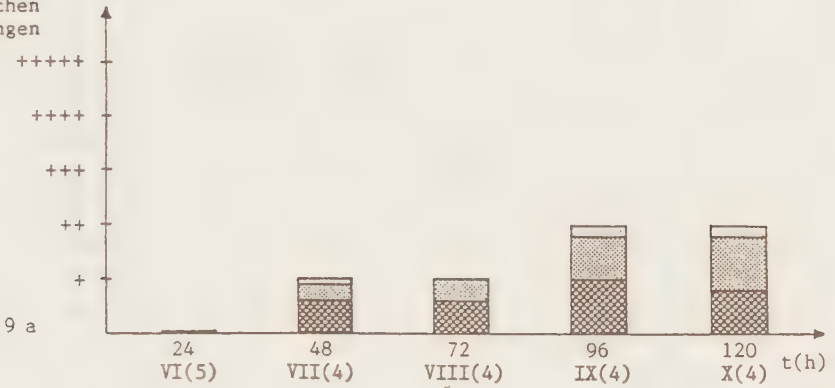


Abb. 9b: Stärke der Fußsohlenschwellung, gemessen in verschiedenen Zeitabständen nach Fußsohleninjektion

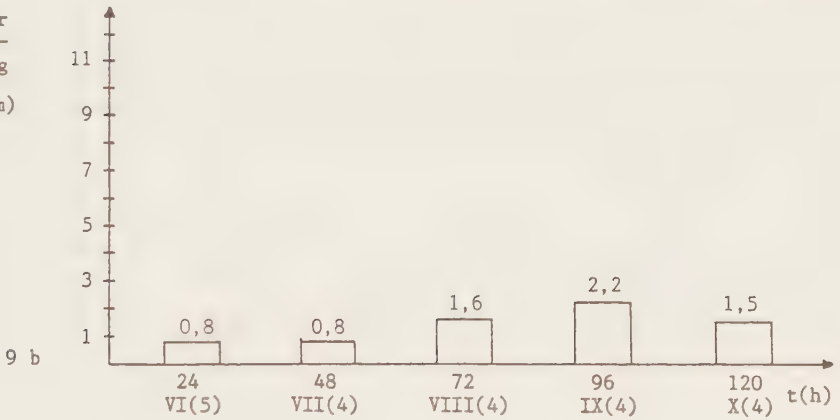
Abb. 9c: Gruppen- Mittelwert der durch *S. cholerae* suis- Antiserum mit der ABC- Methode positiv dargestellten Zellen pro Schnitt

Abb. 9 a - c / Versuch 86 - 5 / VI - X

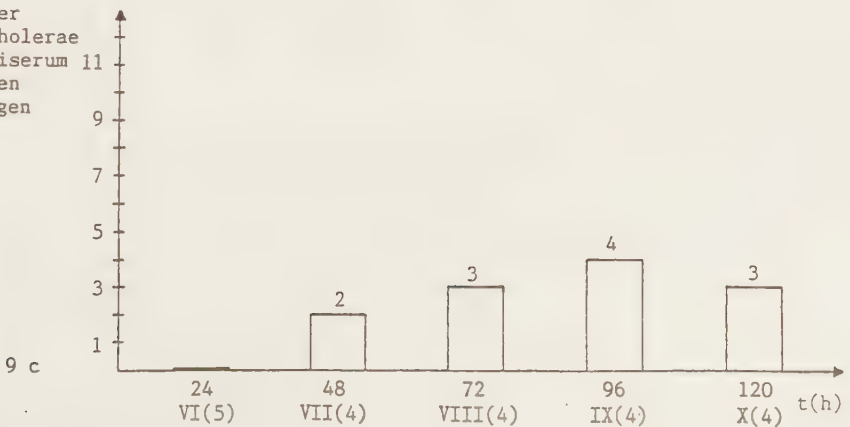
Ausmaß der
entzündlichen
Veränderungen



Stärke der
Fußsohlen-
schwellung
($\times 10^{-1}$ mm)



Anzahl der
mit *S. cholerae*
suis-Antiserum
markierten
Makrophagen



3.4. Versuch 86-8 (Abbildung 10a - c; Tabelle 8)

In der Abbildung 10a - c sind die Ergebnisse der Untersuchung graphisch dargestellt.

Die mit 1 μ g OMP des Stammes 38-9 injizierten Mäuse der Gruppen I und II zeigen bei der histopathologischen Untersuchung der Fußsohlen 48 Stunden nach Injektion eine histio- lymphozytär betonte Entzündungsreaktion. Bei den mit Stamm 33-13 immunisierten Mäusen der Gruppe I erreichen die entzündlichen Veränderungen ein mittelgradiges Ausmaß, während sie bei den nicht- immunisierten Tieren der Gruppe II geringgradig sind.

Die gemessene Fußsohlenschwellung ist bei den Mäusen der Gruppen I und II unterschiedlich stark. Nach Vorimmunisierung und OMP- Injektion beträgt der Mittelwert für die Tiere der Gruppe I $3,6 \times 10^{-1}$ mm. Bei den nicht- geimpften Tieren der Gruppe II schwellen die Fußsohlen im Mittel um $0,7 \times 10^{-1}$ mm an.

Eine sehr große Anzahl immunhistochemisch positiv markierter Makrophagen ist 48 Stunden post applicationem in den histologischen Präparaten der mit OMP injizierten und ungeimpften Mäuse der Gruppe II nachweisbar. Bei der Durchmusterung der nach der ABC- Methode behandelten Schnitte der vorimmunisierten (Stamm 33-13) und mit OMP des Stammes 38-9 injizierten Tiere der Gruppe I lassen sich weniger positiv markierte Zellen auffinden.

Die mit 10^5 lebenden Erregern des virulenten *S. cholerae suis*- Stammes 38-9 in die Fußsohle injizierten Tiere der Gruppen III und IV zeichnen sich durch eine betont granulozytäre Entzündung aus. Bei den mit 10^3 Erregern des avirulenten Stammes 33-13 geimpften Mäusen der Gruppe III sind die entzündlichen

Veränderungen hochgradig, während die entzündliche Reaktion in den Fußsohlen der nicht- immunisierten Tiere der Gruppe IV als mittel- bis hochgradig einzustufen ist.

Die Messung der Fußsohlenschwellung liefert bei den mit 10^5 lebenden Erregern des Stammes 38-9 injizierten Tieren der Gruppen III und IV sehr hohe Werte. Die Schwellungsreaktion der immunisierten (Stamm 33-13) Tiere der Gruppe III ist mit $11,2 \times 10^{-1}$ mm etwas stärker als die der nicht- geimpften Tiere der Gruppe IV ($10,0 \times 10^{-1}$ mm).

Eine geringere Anzahl positiv markierter Makrophagen als bei den mit OMP (Stamm 38-9) injizierten Mäusen der Gruppen I und II ist bei den mit 10^5 lebenden Erregern des virulenten Stammes 38-9 injizierten Tieren der Gruppen III und IV nachweisbar. Bei den immunisierten Tieren der Gruppe III lassen sich im Mittel weniger markierte Makrophagen als bei den nicht- geimpften Mäusen der Gruppe IV darstellen.

Abbildung 10a - c/ 86-8

Immunisierung: I u. III: 10^3 lebende *S. cholerae* suis 33-13
II u. IV : -

Fußsohleninjektion: I u. II : $1\mu\text{g}$ OMP (*S. cholerae* suis 38-9)
IIIu. IV : 10^5 lebende *S. cholerae* suis 38-9

I(n)

I Gruppenbezeichnung

(n) Anzahl der Tiere pro Gruppe

Abb. 10a: Ausmaß der entzündlichen Veränderungen und relativer Anteil der verschiedenen Zellpopulationen am entzündlichen Zellinfiltrat 48 Stunden nach Fußsohleninjektion

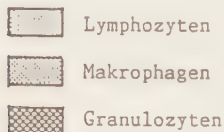
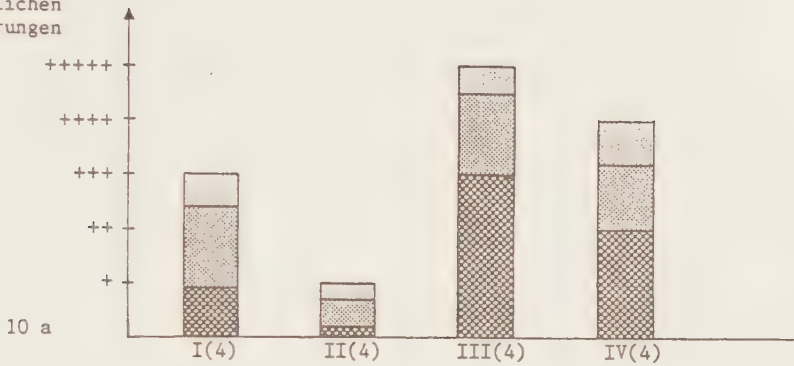


Abb. 10b: Stärke der Fußsohlenschwellung, gemessen 48 Stunden nach Fußsohleninjektion

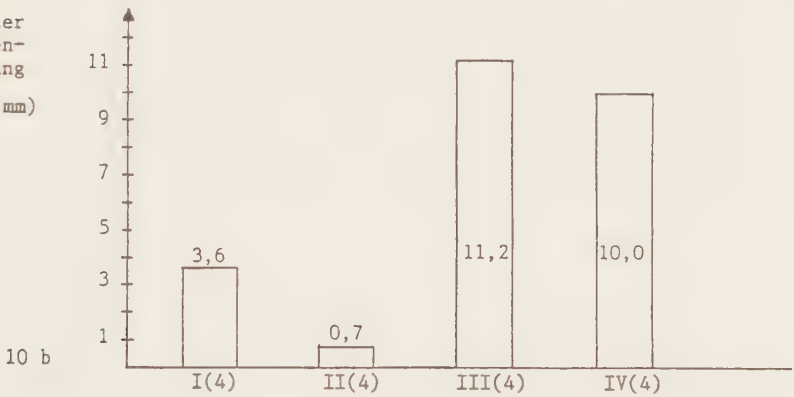
Abb. 10c: Gruppen- Mittelwert der durch *S. cholerae* suis- Antiserum mit der ABC- Methode positiv dargestellten Zellen pro Schnitt

Abb. 10 a - c / Versuch 86 - 8

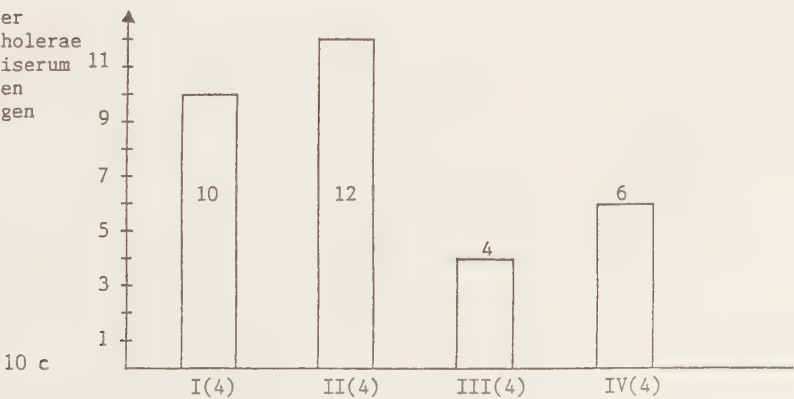
Ausmaß der
entzündlichen
Veränderungen



Stärke der
Fußsohlen-
schwellung
($\times 10^{-1}$ mm)



Anzahl der
mit *S. cholerae*
suis-Antiserum
markierten
Makrophagen



E. DISKUSSION

Die dargestellten Versuche sollten Aufschluß geben über folgende Fragestellungen:

- Inwieweit ist eine Beeinflussung der Fußsohlenreaktion durch eine Vorimmunisierung nachweisbar?
- Wie stellt sich die Fußsohlenreaktion in unterschiedlichen Zeitabständen nach Injektion morphologisch dar?
- Sind hierbei Unterschiede nach Injektion avirulenter oder virulenter *S. cholerae suis*- Stämme feststellbar?
- Ist eine Fußsohlenreaktion nach Injektion des Bakterienwandextraktes OMP auslösbar?
- Ergeben sich Unterschiede in Art und Ausmaß der Fußsohlenreaktion nach Injektion von OMP bzw. lebenden *S. cholerae suis*- Erregern?

Dazu wurden 3 verschiedene Versuche durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Einzelversuche können wie folgt bewertet werden.

Versuch 86-3

Anhand der Ergebnisse des Versuches 86-3 soll eine Aussage über den Einfluß einer Vorimmunisierung mit einem avirulenten Salmonellenstamm auf die Fußsohlenreaktion nach Injektion des virulenten *S. cholerae suis*- Stammes 38-9 gemacht werden.

Die Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung lassen eine Abhängigkeit der entzündlichen Footpadreaktion von der zur Immunisierung verwandten Erregerdosis erkennen. Dies läßt sich am Vergleich der folgenden Versuchsgruppen aufzeigen:

Bei den mit $1,4 \times 10^2$ avirulenten *S. cholerae suis* 33-13 immunisierten Mäusen (Gruppe IV, Abb. 7a) tritt eine schwache entzündliche Reaktion nach Fuß-

sohleninjektion auf, die vermutlich auf einer geringeren Sensibilisierung durch die niedrige Impfdosis beruht. Hingegen liegt ab einer Immunisierungsdosis von $1,4 \times 10^3$ Erregern eine hochgradige, entzündliche Reaktion vor. Die Erhöhung der Immunisierungsdosis auf $1,4 \times 10^5$ bzw. 10^6 Erreger läßt keine Steigerung der entzündlichen Veränderungen erkennen. Bei gegenüber Salmonellen genetisch unterschiedlich empfänglichen Mäusestämmen gelingt es Killar und Eisenstein (1986) erst mit einer Mindestimmunisierungsdosis von 9×10^4 Erregern eines avirulenten *S. typhimurium*- Stammes, eine DTH- Reaktion auszulösen.

Darüber hinaus ergibt sich bei den Gruppen des Versuches 86-3 mit zunehmendem zeitlichen Abstand von der Fußsohleninjektion eine Verschiebung der Zusammensetzung der vorherrschenden Entzündungszellpopulation (Abb. 7a). Nach 48 bzw. 72 Stunden bestimmen Infiltrate mit neutrophilen Granulozyten den Entzündungscharakter, während nach 96 Stunden eine vorwiegend mononukleäre Zellinfiltration gegeben ist.

Die dezenten entzündlichen Veränderungen in den kontralateralen Kontrollfüßen werden in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Collins und Mackaness (1968) als Folge des Injektionstraumas interpretiert.

Betrachtet man Charakter und Zeitverlauf der entzündlichen Reaktion bei den Mäusen der 4 Gruppen des Versuches 86-3, so erlauben die bei der histopathologischen Untersuchung festgestellten Veränderungen weder eine eindeutige Zuordnung zu dem in der Literatur (Tizard, 1981; Male, 1986) beschriebenen Erscheinungsbild einer Arthus- Reaktion, noch entsprechen sie den Veränderungen einer typischen DTH-

Reaktion. Diese Beobachtung stimmt mit einer Mitteilung von Collins und Mackaness (1968) überein, die die entzündliche Reaktion als gemischte Arthus- DTH-Reaktion deuten. Nach Aussage der Autoren tritt diese gemischte Reaktion bei einer mehr als 20 Tage nach Immunisierung der Mäuse mit lebenden *S. gallinarum* erfolgenden Fußsohleninjektion auf. Cho et al. (1983) zufolge ist 30 Tage nach Immunisierung von Mäusen mit einem rauen *S. typhimurium*- Stamm keine DTH- typische Fußsohlenreaktion mehr vorhanden.

Auch bei Mäusen, die 8 Tage zuvor mit einem attenuierten *S. typhimurium*- Stamm immunisiert wurden, zeigen sich nach Smith und Bigley (1972) und Hormaeche et al. (1979) bei der histologischen Untersuchung der Footpads 48 Stunden nach Injektion mononukleäre Zellen und polymorphkernige Granulozyten, aber keine Anzeichen einer eindeutigen DTH.

Bezüglich der Korrelation zwischen der Anzahl immunohistochemisch nachweisbarer Erreger und dem histopathologischen Befund lassen sich für Versuch 86-3 (Abb. 7a und c) folgende Aussagen machen:

Bei den Tieren der Gruppe IV/ 86-3 (Immunisierung mit $1,4 \times 10^2$ Erregern, Stamm 33-13) ist 96 Stunden nach Fußsohleninjektion die größte Anzahl erregerehaltiger Makrophagen bei der insgesamt geringsten entzündlichen Reaktion nachweisbar. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Marecki et al. (1975) wäre eine Erklärung dadurch möglich, daß sich die Mehrzahl der Salmonellen nach einer Infektion zuerst extrazellulär vermehrt, um nach 96 Stunden von den verstärkt auftretenden Makrophagen aufgenommen zu werden.

In den hochgradig entzündlich veränderten Fußsohlen der mit etwas höherer Dosis ($1,4 \times 10^3$ Erreger) immunisierten Mäuse (Gruppe III/ 86-3) zeigen sich,

ebenso nach 96 Stunden, im Durchschnitt weniger erregerhaltige Makrophagen. Die etwas höhere Immunisierungsdosis bei Gruppe III/ 86-3 könnte zu der von Tizard (1981) und Kita et al. (1986) erwähnten Aktivierung einer größeren Zahl von Makrophagen geführt haben, die daraufhin in der Lage wären, die Salmonellen nicht nur zu phagozytieren, sondern auch zu zerstören.

Die mit einer noch höheren Erregerdosis ($1,4 \times 10^6$ bzw. $1,4 \times 10^8$ Erreger) immunisierten Tiere (Gruppe I und II/ 86-3) zeigen 48 bzw. 72 Stunden nach Injektion eine starke, betont granulozytäre entzündliche Reaktion und eine geringe Anzahl erregerhaltiger Makrophagen (Abb. 7a und c). Nach Griffith und Kramer (1983) spielen Phagozytose und Tötung von *S. cholerae suis*- Erregern durch polymorphkernige Granulozyten in den initialen Stadien einer Infektion beim Schwein eine wichtige Rolle für den Ausgang des Krankheitsprozesses.

Versuch 86-5

Anhand der Ergebnisse des Versuches 86-5 läßt sich eine Aussage machen über den Zeitverlauf der Fußsohlenreaktion bei nicht immunisierten Mäusen nach Injektion von lebenden Erregern des avirulenten *S. cholerae suis*- Stammes 33-13 (Gruppe I bis V) bzw. des virulenten *S. cholerae suis*- Stammes 38-9 (Gruppe VI bis X).

Vergleicht man die histopathologischen Befunde der mit Stamm 33-13 injizierten Mäuse (Gruppe I bis V/ 86-5, Abb. 8a) mit den Befunden der mit Stamm 38-9 injizierten Tiere (Gruppe VI bis X/ 86-5, Abb. 9a), so fällt folgendes auf: Sowohl nach Injektion von Stamm 33-13 als auch von Stamm 38-9 nimmt das Ausmaß der entzündlichen Veränderungen mit wachsendem

zeitlichen Abstand von der Fußsohleninjektion zu. Nach Applikation von Stamm 33-13 erreicht die entzündliche Reaktion erst nach 120 Stunden ihr relatives Maximum (Gruppe V/ 86-5, Abb. 8a), nach Injektion von Stamm 38-9 schon nach 96 Stunden (Gruppe IX/ 86-5, Abb. 9a). Die Zusammensetzung der Entzündungszellpopulation weist nach Injektion beider Salmonellenstämme in annähernd gleicher Dosierung keine Unterschiede auf, im zeitlichen Verlauf werden Granulozyten zunehmend durch mononukleäre Zellen ersetzt. Letztere herrschen bereits 72 Stunden nach Injektion von Stamm 33-13 (Gruppe III/ 86-5, Abb. 8a) vor, aber nach Injektion von Stamm 38-9 (Gruppe IX/ 86-5, Abb. 9a) erst nach 96 Stunden. Vergleichbar zu den vorimmunisierten und mit Stamm 38-9 injizierten Mäusen der Gruppen I und II des Versuches 86-3 (Abb. 7a) zeigt sich bis 48 Stunden nach Injektion von *S. cholerae* suis 33-13 (Gruppe II/ 86-5, Abb. 8a) und bis 72 Stunden nach Injektion von *S. cholerae* suis 38-9 (Gruppe IX/ 86-5, Abb. 9a) eine starke Granulozyteninfiltration des Gewebes. Nach Griffith und Kramer (1983) werden die *S. cholerae* suis-Keime vor allem in den frühen Stadien einer Infektion beim Schwein von den zahlreich auftretenden Granulozyten aufgenommen und abgetötet.

Da 120 Stunden nach Injektion von Stamm 33-13 (Gruppe V/ 86-5, Abb. 8a) noch mittelgradige entzündliche Veränderungen nachweisbar sind, scheint *S. cholerae* suis 33-13 zu den von Collins et al. (1966) und Udayakumar und Muthukkaruppan (1983) erwähnten Stämmen zu gehören, die trotz ihrer Avirulenz im Gewebe persistieren und sich vermehren können.

Anhand des Vergleiches der in verschiedenen Zeitabständen nach Injektion von Stamm 33-13 bzw. 38-9

nachgewiesenen Anzahl immunhistochemisch markierter, erregerhaltiger Makrophagen (Abb. 8c u. 9c) ist eine Aussage über die unterschiedliche Phagozytose und Tötung der beiden Erregerstämme durch Makrophagen möglich.

24 Stunden nach Injektion von Stamm 33-13 (Gruppe I/ 86-5, Abb. 8c) sind schon einige wenige, erregerhaltige Makrophagen nachweisbar, während 24 Stunden nach Injektion von Stamm 38-9 (Gruppe VI/ 86-5, Abb. 9c) noch keine markierten Makrophagen darstellbar sind. Dies findet eine Erklärung in der Aussage von Friedberg und Shilo (1970), wonach rauhe *S. typhimurium*- Stämme mit inkomplettem LPS- Kern wesentlich schneller von Mäusemakrophagen aufgenommen werden als die s- Formen mit komplettem LPS- Kern.

Sowohl 24 Stunden nach Injektion von Stamm 33-13 (Gruppe I/ 86-5, Abb. 8c) als auch 48 Stunden nach Injektion von Stamm 38-9 (Gruppe VII/ 86-5, Abb. 9c) sind mehr erregerhaltige Makrophagen nachweisbar als 48 Stunden nach Verabreichung von Stamm 33-13 (Gruppe II/ 86-5, Abb. 8c). In Übereinstimmung mit den Aussagen von Hsu und Radcliffe (1968) läßt sich daraus folgern, daß die Erreger des virulenten Stammes 38-9 nach einer Infektion in geringerem Maße zerstört werden als die Keime des avirulenten Stammes 33-13. Beide *S. cholerae suis*- Stämme beginnen zeitversetzt mit ihrer Vermehrung. Daraus läßt sich schließen, daß in gleichen Zeitabständen nach Injektion von Stamm 38-9 (Abb. 9c) eine größere Anzahl markierter Makrophagen darstellbar sind als nach Injektion von Stamm 33-13 (Abb. 8c).

Versuch 86-8

Versuch 86-8 soll Aufschluß geben über die unter-

schiedliche Fußsohlenreaktion 48 Stunden nach Injektion von OMP des *S. cholerae suis*- Stammes 38-9 (Gruppe I und II/ 86-8, Abb. 10a) bzw. lebenden Erregern des Stammes 38-9 (Gruppe III und IV/ 86-8, Abb. 10a) mit und ohne Vorimmunisierung.

Bei den mit OMP injizierten Tieren zeigt sich eine Ödematisierung und vorherrschend mononukleäre Entzündungszellinfiltration, die bei den immunisierten Mäusen mittelgradig und bei den nicht immunisierten Tieren geringgradig ist (Abb. 10a). Damit ist als Folge der Immunisierung das Ausmaß der entzündlichen Zellinfiltrate und der Ödematisierung größer, hingegen ist die Zusammensetzung der Entzündungszellpopulation bei den immunisierten und nicht immunisierten Tieren identisch, vorwiegend mononukleär.

Dahingegen läßt sich bei den mit 10^5 lebenden *S. cholerae suis* 38-9 injizierten Mäusen (Gruppe III und IV/ 86-8, Abb. 10a) kein deutlicher Immunisierungseffekt erkennen. Der Charakter der entzündlichen Reaktion ist bei den geimpften und nicht geimpften Tieren vorherrschend granulozytär, das Ausmaß der entzündlichen Veränderungen differiert nur gering. Bei beiden Gruppen ist eine hochgradige Ödematisierung des Fußsohlengewebes nachweisbar. Gleichfalls keinen deutlichen Effekt einer Immunisierung (10^5 avirulente *S. typhimurium*) stellen Cho et al. (1983) bei Auslösung einer Fußsohlenreaktion mit 10^6 abgetöteten Erregern fest. Möglicherweise ist, unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Killar und Eisenstein (1986), auch die Immunisierungsdosis von 10^3 Erregern zu gering. Die Autoren nennen zur Auslösung einer DTH eine Mindestimmunisierungsdosis von 10^4 avirulenten Erregern.

Die Fußsohlenreaktion nach Injektion von $1 \mu\text{g}$ OMP (Gruppe I und II/ 86-8, Abb. 10a) differiert stark

von der Reaktion nach Injektion von 10^5 lebenden Erregern (Gruppe III und IV/ 86-8, Abb. 10a).

Das Ausmaß der entzündlichen Reaktion nach OMP- Injektion ist sehr viel geringer als nach Applikation lebender Salmonellen. Ebenfalls deutliche Unterschiede lassen sich bezüglich des Charakters des entzündlichen Zellinfiltrates erkennen. Nach Injektion von OMP herrschen mononukleäre Zellen vor, während die Verabreichung von lebenden Erregern eine eitrig- phlegmonöse Entzündung nach sich zieht. Der vorwiegend mononukleäre, aber auch granulozytäre Charakter des entzündlichen Zellinfiltrates nach OMP- Injektion (Gruppe I und II/ 86-8, Abb. 10a) wird durch die Mitteilungen von Udhayakumar und Muthukkaruppan (1987b) bestätigt. Nach Aussage der Autoren ist ein, auch bei den Mäusen des Versuches 86-8 (Gruppe I und II) verwandter, mit LPS verunreinigter Proteinextrakt der Bakterienaußenmembran (OMP) für die Infiltration der Reaktionsstelle mit neutrophilen Granulozyten verantwortlich. Eine eindeutige DTH- Reaktion mit nahezu rein mononukleärer Zellinfiltration läßt sich nur mit einem hochgereinigten Proteinextrakt der Salmonellenwand ("porin") auslösen.

Die starke Ödematisierung und eitrig- phlegmonöse Entzündung bei den mit lebenden Erregern injizierten Mäusen (Gruppe III und IV/ 86-8, Abb. 10a) läßt sich als Folge der hohen Dosierung von 10^5 virulenten *S. cholerae suis*- Keimen verstehen.

Aus Abbildung 10c/ 86-8 können in Form der Anzahl immunhistochemisch markierter Makrophagen in den histologischen Schnitten der mit $1 \mu\text{g}$ OMP injizierten Mäuse (Gruppe I und II/ 86-8) Informationen zur Phagozytierbarkeit von OMP gewonnen werden. Es fällt auf, daß bei den mit OMP injizierten Tieren bei

geringerer entzündlicher Reaktion eine wesentlich größere Zahl markierter Makrophagen nachweisbar ist als in den histologischen Präparaten der mit lebenden *S. cholerae* suis 38-9 injizierten Mäusen (Gruppe III und IV/ 86-8) bei starker entzündlicher Reaktion. OMP wird im Zeitraum von 48 Stunden nach Injektion vermutlich weitgehend phagozytiert, wohingegen die lebenden virulenten Salmonellen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Versuche 86-3 (Gruppe I, Abb. 7c) und 86-5 (Gruppe VII, Abb. 9c) in gleichem Abstand von der Injektion nur in geringerem Ausmaß in den Makrophagen nachweisbar sind. Den OMP- Bestandteilen der Bakterienwand scheint somit keine Bedeutung hinsichtlich der den virulenten Salmonellen eigenen geringeren Phagozytierbarkeit zuzukommen; diese wird nach Friedberg und Shilo (1970) verursacht durch den kompletten LPS-Bestandteil der Bakterienwand virulenter Erreger.

Morphologisches Substrat der Fußsohlenschwellung

Bei einem Vergleich der histopathologischen Befunde (Abb. 7a, 8a, 9a, 10a) mit den Meßwerten der Fußsohlenschwellung (Abb. 7b, 8b, 9b, 10b) sämtlicher Gruppen der drei Versuche fällt auf, daß die gemessene Schwellung primär von der Ödematisierung der einzelnen Gewebeschichten abhängig ist. Erst sekundär wird sie vom Ausmaß der entzündlich-zelligen Infiltration beeinflusst. Zur Verdeutlichung sollen die Werte zweier Gruppen des Versuches 86-3 herausgegriffen werden.

Die histopathologische Untersuchung ergibt bei den mit 10^5 *S. cholerae* suis 33-13 immunisierten und mit 10^4 *S. cholerae* suis 38-9 injizierten Mäusen (Gruppe II/ 86-3, Abb. 7a) eine mittel- bis hochgradige entzündliche Reaktion und hochgradige Ödematisierung

der Gewebeschichten. Die Schwellung der Fußsohle ist mit einem Wert von $8,9 \times 10^{-1}$ mm massiv (Abb. 7b). Dagegen ist bei den mit 10^3 S. cholerae suis 33-13 immunisierten und mit 10^4 S. cholerae suis 38-9 injizierten Mäusen (Gruppe III/ 86-3, Abb. 7a) eine hochgradige entzündliche Reaktion und geringe Ödematisierung des Fußsohlengewebes nachweisbar. Die Fußsohlenschwellung ist mit einem halb so hohen Wert wie bei Gruppe II ($4,5 \times 10^{-1}$ mm) ebenfalls geringgradig.

Die histologisch nachgewiesene stärkste Ödematisierung und gleichzeitig die massivste Fußsohlenschwellung tritt bei den Mäusen auf, denen in hoher Dosierung (10^5 S. cholerae suis 38-9) lebende, virulente Erreger zur Auslösung einer Fußsohlenreaktion injiziert wurden (Gruppe III und IV/ 86-8, Abb. 10a und b).

Vergleichende Betrachtung der Versuche 86-3 und 86-8

Zur Wirkung einer Immunisierung auf die Fußsohlenschwellung bzw. deren histopathologisches Korrelat lassen sich folgende Feststellungen treffen: Zur Auslösung einer entsprechenden Fußsohlenreaktion ist eine Immunisierungsdosis von 10^2 avirulenten S. cholerae suis- Keimen (Gruppe II/ 86-3, Abb. 7a u. b) zu gering. Erst bei Immunisierung mit 10^3 avirulenten Erregern (Gruppe III/ 86-3, Abb. 7a u. b) ist eine stärkere Fußsohlenreaktion auslösbar. Killar und Eisenstein (1986) nennen zur Auslösung einer DTH eine Mindestimmunisierungsdosis von 10^4 avirulenten S. typhimurium. Eine durch weitere Steigerung der Immunisierungsdosis (bis 10^5 S. cholerae suis 33-13) verursachte stärkere Fußsohlenschwellung wird letztlich vor allem durch eine stärkere Gewebeödematisierung hervorgerufen (Gruppe II/ 86-3, Abb. 7a

u. b). Die noch höhere Immunisierungsdosis von 10^6 *S. cholerae* suis 33-13 bewirkt keine stärkere entzündliche Reaktion und in Übereinstimmung mit Cho et al. (1983) auch keine weitere Zunahme der Fußsohlenschwellung (Gruppe I/ 86-3, Abb. 7a u. b).

Ein Vergleich des histopathologischen Befundes und des Meßwertes der Fußsohlenschwellung 48 Stunden nach Injektion von Mäusen der Gruppe I/ 86-3 (Impfung mit 10^6 *S. cholerae* suis 33-13, Injektion mit 10^4 *S. cholerae* suis 38-9) mit Mäusen der Gruppe IV/ 86-8 (keine Impfung, Injektion mit 10^5 *S. cholerae* suis 38-9) erlaubt eine weitere Aussage zur Wirkung der Immunisierung auf die Fußsohlenreaktion. Ausmaß und Charakter der entzündlichen Reaktion stimmen bei geimpften und nicht geimpften Tieren (Gruppe I/ 86-3, Abb. 7a; Gruppe IV/ 86-8, Abb. 10a) überein. Lediglich die Ödematisierung und damit die Fußsohlenschwellung ist bei den nicht immunisierten Tieren (Gruppe IV/ 86-8, Abb. 10b) stärker als bei den immunisierten Tieren (Gruppe I/ 86-3, Abb. 7b). Dieser Unterschied ist vermutlich auf die um eine 10er- Potenz höher dosierte Fußsohleninjektion mit lebenden *S. cholerae* suis 38-9 bei den nicht immunisierten Tieren zurückzuführen. Damit wird der Einfluß der Fußsohleninjektionsdosis auf die Fußsohlenreaktion dokumentiert.

Eine deutliche Wirkung der Immunisierung mit 10^3 *S. cholerae* suis 33-13 auf die Fußsohlenreaktion ist lediglich bei den mit $1 \mu\text{g}$ OMP injizierten Mäusen (Gruppe II/ 86-8, Abb. 10a) festzustellen. Im Vergleich zu den nicht immunisierten Tieren (Gruppe I/ 86-8, Abb. 10a) ist die gleichfalls vorwiegend mononukleäre entzündliche Reaktion stärker. Die Ödematisierung ist bei beiden Gruppen gering. Daher beruht die stärkere Fußsohlenschwellung in diesem

Fall vor allem auf der stärkeren entzündlich-zelligen Infiltration.

Zusammenfassend scheint die Fußsohlenreaktion, ausgelöst durch eine OMP- Injektion, ein geeigneteres Kriterium für die Ausbildung einer erworbenen zellulären Immunität gegen eine Salmonelleninfektion zu sein als die durch Injektion lebender virulenter Salmonellen hervorgerufene Reaktion.

Immunhistochemischer Erregernachweis

Die immunhistochemische Nachweisbarkeit von Bakterien an Paraffinmaterial ist in der Literatur dokumentiert, es existieren bislang aber erst relativ wenige Mitteilungen.

An dem zur Verfügung stehenden Material werden die ABC- und die PAP- Methode vergleichend eingesetzt. Mit dem PAP- Verfahren lassen sich nur undeutliche Erregermarkierungen erreichen, wohingegen sich mittels der ABC- Technik eine kräftigere Anfärbung von Salmonellen bzw. Salmonellenantigen erzielen läßt. Diese stärkere Anfärbung der Bakterien bei der ABC- Methode resultiert aus der Bildung des von Hsu et al. (1981a) und Hsu und Raine (1984) beschriebenen Gitterkomplexes, der mehr Peroxidase-moleküle enthält als der PAP- Komplex. Daher sind in Übereinstimmung mit Hsu und Raine (1981) und Hall und Ward (1984) bei der ABC- Methode primärer und sekundärer Antikörper in höherer Verdünnung (1:400 statt 1:200 bzw. 1:200 statt 1:60) verwendbar als bei der PAP- Methode. Die stärker verdünnten Antikörperlösungen bedingen eine geringere unspezifische Hintergrundanfärbung und damit die auch von Giorno (1984) festgestellte bessere Kontrastierung der ABC- gefärbten Schnitte.

Nach Hsu et al. (1981b) geht die hohe Antikörperver-

dünnung allerdings ein wenig auf Kosten der Sensitivität des Nachweises, die nach Denk (1986) aber 8 - 40mal höher ist als die der PAP- Methode.

Die unspezifische, bei Anwendung der ABC- Methode auftretende Mastzellanfärbung stellt in Übereinstimmung mit Hall und Ward (1984) und Hsu und Raine (1984) einen Nachteil gegenüber der PAP- Methode dar. Bussolati und Gugliotta (1983) empfehlen zur Vermeidung der unspezifischen Mastzellmarkierung die Verwendung einer ABC- Lösung von pH 9,4 statt pH 7,6. Dies läßt sich durch die eigenen Untersuchungen nicht bestätigen. Bei Inkubation der Schnitte mit normalem Kaninchenserum in einer der Antikörperlösung entsprechenden Verdünnung bzw. PBS anstelle des primären Antikörpers zeigt sich keine Anfärbung erregerehaltiger Makrophagen, wohl aber eine unspezifische Mastzellanfärbung. Diese Ergebnisse stimmen mit der Aussage von Hsu und Raine (1984) überein, denen die Vermeidung dieser falsch-positiven Mastzellanfärbung weder in Gefrier- noch in Paraffinschnitten gelingt. Eine Inkubation der Schnitte lediglich mit dem AEC- Farbstoff verhindert hingegen die Anfärbung der Mastzellen. Dadurch wird die Aussage von Bergstresser et al. (1984) und Tharp et al. (1985) bestätigt, wonach ein Bestandteil des ABC- Komplexes, nämlich Avidin, für die Bindung des Komplexes an Mastzellgranula und damit für die unspezifische Anfärbung verantwortlich ist. Die Feststellung, daß die Granula der Mastzellen für die unspezifische Markierung verantwortlich sind, wird in Übereinstimmung mit Tharp et al. (1985) durch die Anfärbung extrazellulär liegender Granula untermauert. Nach Wood und Warnke (1981) erfolgt eine Bindung von Avidin an Biotin oder Biotin- ähnliche Substanzen in oder auf den Granula der Mastzellen.

Das für den immunhistochemischen Nachweis als primä-

rer Antikörper verwandte Antiserum stammt aus mit *S. cholerae* suis 38-9 immunisierten Kaninchen. Dieses Antiserum zeigt Reaktivität gegenüber beiden *S. cholerae* suis- Stämmen (38-9 und 33-13) sowie gegenüber OMP des Stammes 38-9.

Die injizierten Erreger bzw. das Erregerantigen lassen sich in aller Regel intrazellulär lokalisieren. Die Bakterien sind vor allem im Zytoplasma von verstreut im Gewebe, im Randbereich größerer Entzündungsherde liegenden Makrophagen, als feinstaubige oder diffuse orange-rote Färbung (AEC) nachweisbar (Abb. 4 u. 5). Trotz der üblicherweise eingesetzten Verfahren zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität ist bei einer sich in Einzelfällen darstellenden Farbreaktion im Zytoplasma neutrophiler Granulozyten keine klare Abgrenzung von markierten Erregern möglich. Deshalb kann für massiv granulozytär infiltrierte Areale eine Aussage zur Erregerlokalisation nur eingeschränkt gemacht werden. Extrazelluläre Farbniederschläge sind nur undeutlich zu erkennen und schwer von einer unspezifischen Gewebeanfärbung abgrenzbar. McRill et al. (1984) gelingt mit der PAP- Methode die Darstellung von *S. cholerae* suis- Erregern in Formalin- fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebematerial vom Schwein selten in Verbindung mit histologisch erkennbaren Läsionen, sondern diffus verteilt im Gewebe. *S. typhimurium*- Keime werden nach Pospischil und Wood (1986) mit der PAP- Technik in der Lamina propria des Darmes infizierter Schweine eher extrazellulär gefunden. Anderson et al. (1986) und Meador et al. (1986) weisen Brucellen mit der ABC- Methode intra- und extrazellulär vor allem im Bereich entzündlicher Foci nach. Haritani et al. (1987) dagegen stellen *Pasteurella hämolytica*- Erreger vor allem am Rande nekrotischer Herde im Zyto-

plasma von Makrophagen und degenerierenden Granulozyten dar.

Die Differenzierung markierter, erregerhaltiger Makrophagen von unspezifisch angefärbten Mastzellen ist aufgrund von Kriterien wie Kernform, Chromatingehalt des Kernes, Kern- Zytoplasma- Relation und der Intensität der Mastzellgranula- Anfärbung möglich (Abb. 4, 5 u. 6).

Die Bedeutung immunhistochemischer Methoden zur Erregeridentifizierung an Paraffinmaterial ist nach Domingo et al. (1986) vor allem für den Nachweis von schwer anzüchtbaren, bakteriellen Erregern gegeben. Ein zusätzlicher Vorteil ist darin zu sehen, Krankheitserreger am Ort der durch sie verursachten Gewebeschädigung nachzuweisen.

Abschließend lassen sich die in der Einleitung genannten Fragestellungen folgendermaßen beantworten:

Das Ausmaß der entzündlichen Fußsohlenreaktion bei nicht immunisierten Mäusen wird mit zunehmendem zeitlichen Abstand von der Injektion stärker, dabei läßt sich im Zeitverlauf eine Verschiebung von granulozytären zu mononukleären Zellelementen beobachten. Nach Injektion avirulenter und virulenter Erreger lassen sich keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich Art und Ausmaß der entzündlichen Fußsohlenreaktion feststellen. Nach Injektion lebender Erreger in die Fußsohle stimmen Ausmaß und Charakter der entzündlichen Reaktion bei geimpften und nicht geimpften Tieren weitgehend überein. Ein Einfluß der Vorimmunisierung läßt sich hierbei nicht deutlich erkennen, wenngleich bei relativ niedriger Immunisierungsdosis eine vergleichsweise geringe entzündliche Reaktion zu verzeichnen ist. Durch Injektion von OMP läßt sich eine Fußsohlenreaktion auslösen,

wobei in diesem Falle eine deutliche Wirkung der Immunisierung mit avirulenten Erregern in Form stärkerer entzündlich- zelliger Infiltration festzustellen ist. Bezüglich Art und Ausmaß der Fußsohlenreaktion nach Injektion von OMP bzw. lebenden virulenten *S. cholerae suis*- Erregern bestehen deutliche Unterschiede. Die entzündlichen Veränderungen nach OMP- Injektion sind geringer als nach Injektion lebender Erreger; der Charakter der entzündlichen Reaktion ist nach OMP- Injektion vorwiegend mononukleär. Der Vergleich von histopathologischen Befunden und Messwerten der Fußsohlenschwellung läßt erkennen, daß die Stärke der Fußsohlenschwellung nach Injektion lebender Erreger primär von der Gewebeödematisierung und weniger von der zellig-entzündlichen Infiltration des Gewebes abhängig ist.

Mit immunhistochemischen Methoden lassen sich sowohl virulente und avirulente, lebende *S. cholerae suis*- Erreger als auch das Erregerantigen in Form des OMP des virulenten Stammes nachweisen. Hierbei ist eine bessere Eignung des ABC- Verfahrens gegenüber der PAP- Methode gegeben.

Aufgrund der Ergebnisse der Versuche scheint die Injektion des Salmonellenwandextraktes OMP geeignet zu sein, den individuellen Immunstatus eines Tieres abzuschätzen. Eine noch eindeutigere Aussage zur Immunität ließe sich möglicherweise durch Verwendung eines hochgereinigten Proteinextraktes (Porin) erzielen. Damit wäre eine nahezu rein mononukleäre Zellinfiltration des Fußsohlengewebes zu erwarten, unerwünschte eitrig- entzündliche Komponenten könnten vermieden werden. Hingegen ist die Beurteilung der Fußsohlenreaktion nach Injektion lebender Erreger aufgrund der massiven eitrig- phlegmonösen Entzündung erschwert.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Gegen *Salmonella cholerae suis* immunisierten und nicht immunisierten Mäusen wurden lebende avirulente (Stamm 33-13) oder virulente (Stamm 38-9) *S. cholerae suis*- Erreger bzw. ein Bakterienwandextrakt (OMP- Stamm 38-9) in die Fußsohle injiziert. Die dadurch ausgelösten entzündlichen Veränderungen des Fußsohlengewebes wurden histopathologisch untersucht. Es erfolgte eine semiquantitative Erfassung von Ausmaß und Charakter der entzündlichen Reaktion. Die histopathologischen Befunde wurden mit Messwerten der Fußsohlenschwellung korreliert.

Ferner erfolgte an Paraffinschnitten eine Darstellung der Erreger bzw. des Erregerantigens mittels immunhistochemischer Methoden (ABC- und PAP- Methode). Die darstellbaren Erreger wurden unter Berücksichtigung ihrer Lokalisation semiquantitativ erfaßt.

Die Versuchsergebnisse stellen sich folgendermaßen dar:

Die entzündlichen Veränderungen des Fußsohlengewebes nach Injektion lebender Erreger bei nicht immunisierten Mäusen nehmen im Zeitverlauf nach Injektion zu. Nach anfänglichem Vorherrschen neutrophiler Granulozyten in der Entzündungszellpopulation treten nach 96 Stunden vermehrt mononukleäre Zellen in Erscheinung. Hierbei lassen sich bezüglich der beiden eingesetzten Salmonellenstämme keine wesentlichen Unterschiede feststellen. Die Auswirkung einer Vorimmunisierung auf die Fußsohlenreaktion nach Injektion lebender Erreger bzw. von OMP läßt sich unterschiedlich verifizieren. Nach Injektion lebender Erreger ist eine massive eitrige phleg-

monöse Entzündung des Gewebes zu verzeichnen. Für immunisierte und nicht immunisierte Tiere lassen sich keine deutlichen Unterschiede erkennen. Dagegen ist die Fußsohlenreaktion nach OMP- Injektion bei immunisierten und nicht immunisierten Tieren deutlich verschieden. Hierbei herrschen mononukleäre Zellen vor. Die Fußsohlenschwellung wird in erster Linie durch die Ödematisierung des Gewebes hervorgerufen. Lediglich bei den mit OMP injizierten Mäusen hängt die Dickenzunahme des Fußes in erster Linie von der entzündlich- zelligen Infiltration des Gewebes ab.

Sowohl mit der ABC- Methode als auch mit dem PAP- Verfahren lassen sich die beiden Erregerstämme als auch OMP nachweisen und überwiegend in Makrophagen lokalisieren. Bei Verwendung des ABC- Verfahrens sind jedoch eindeutig bessere Ergebnisse zu erzielen.

SUMMARY

Histopathological and immunohistochemical investigation of footpad reaction of mice infected with *Salmonella cholerae suis*.

Living non virulent (strain 33-13) or virulent (strain 38-9) *Salmonella cholerae suis* bacteria or OMP (strain 38-9) were injected into the footpads of mice that had been immunised against *Salmonella cholerae suis* and into those of non-immunised mice. The resulting changes due to the inflammation of the footpad tissue were histopathologically investigated. The extent and the character of these changes were semi-quantitatively determined. The histopathological results were correlated with the measurements of the footpad swelling.

In addition the bacteria or bacteria antigen were identified in paraffin slices by immunohistochemical methods (ABC and PAP method). The identified bacteria were semi-quantitatively determined according to location.

The experimental results are as follows:

The inflammatory changes of the footpad tissue after injection of living bacteria into non-immunised mice increased with time. Initially, polymorphonuclear neutrophils dominate but after a period of 96 hours the mononuclear cells appear with increasing frequency. There is no significant difference in the inflammation caused by the two different salmonella strains. The effect of immunisation on the footpad reaction after injection of living bacteria or OMP varies significantly. After injection of the living bacteria a massive suppurative inflammation of the tissue appears. There is no obvious

difference between immunised and non- immunised animals. In contrast the difference in reaction of the footpad after injection of OMP into immunised and non- immunised animals is sharply evident. In this case mononuclear cells dominate. The footpad swelling is primarily caused by an edema. Only mice injected with OMP display swelling caused by inflammatory cells infiltrating the tissue.

By using either ABC or PAP methods, both bacteria strains as well as OMP can be identified and localised predominantly in macrophages. However the results using the ABC method are distinctly better.

LITERATURVERZEICHNIS

- Aitken, M.M.; Hall, G.A.; Jones, P.W.:
Investigation of a cutaneous delayed hyper-
sensitivity response as a means of detecting
Salmonella dublin infection in cattle.
Res. Vet. Sci. 24, 370-374 (1978)
- Anderson, T.D.; Meador, V.P.; Cheville, N.F.:
Pathogenesis of placentitis in the goat in-
oculated with Brucella abortus. I. Gross and
histologic lesions.
Vet. Pathol. 23, 219-226 (1986)
- Askenase, P.W.; Rosenstein, R.W.; Ptak, W.:
T-cells produce an Antigen- Binding Factor
with in vivo Activity analogous to IgE
Antibody.
J. Exp. Med. 157, 862 (1983)
- Attridge, S.R.; Kotlarski, J.:
Local transfer of delayed- type hypersensi-
tivity after Salmonella infection in mice.
Infect. Immun. 50 (3), 807-812 (1985)
- Baljer, G.:
Salmonellose.
Tierärztl. Umschau 39, 368-375 (1984)
- Baskerville, A.; Dow, C.; Curran, W.L.; Hanna, J.:
Ultrastructure of phagocytosis of S. cholerae
suis by pulmonary macrophages in vivo.
Brit. J. Exp. Pathol. 53; 641-647 (1972)
- Bedrossian, U.K.; Lozona de Arce, E.A.; Bedrossian,
C.W.M.:
Immunoperoxidase Method to Detect Herpes Sim-
plex Virus in Cytologic Specimens.
Laboratory Medicine 15 (10), 673-676 (1984)
- Bergstresser, P.R.; Tigelaar, R.E.; Tharp, P.M.D.:
Conjugated avidin identifies cutaneous rodent
and human mast cells.
J. Invest. Dermatol. 83, 214-218 (1984)
- Blanden, R.V.; Mackaness, G.B.; Collins, F.M.:
Mechanisms of aquired resistance in mouse
typhoid.
J. Exp. Med. 124, 585-600 (1966)

Bosman, F.T.; Cramer- Kujinenburg, G.; van Bergen Henegouw, J.:

Efficiency and sensitivity of immunoperoxidase methods.

Histochemistry 77, 185-194 (1983)

Bourgon, A.R.; Charlton, K.M.:

The Demonstration of Rabies Antigen in Paraffin- embedded Tissues using the Peroxidase- Antiperoxidase Method: A Comparative Study.

Can. J. Vet. Res. 51 (1), 117-120 (1987)

Brown, A.; Hormaeche, C.E.; Demarco de Hormaeche, R.; Winter, M.; Dougan, G.; Maskell, D.J.; Stocker; B.A.:

An attenuated aroA Salmonella typhimurium vaccine elicits humoral and cellular immunity to cloned beta- galactosidase in mice.

J. Infect. Dis. 155 (1), 86-92 (1987)

Burns, J.:

Background staining and sensitivity of the unlabelled antibody- enzyme (PAP) method. Comparison with the peroxidase labelled antibody sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material.

Histochemistry 43, 291-295 (1975)

Bussolati, G.; Alfani, V.; Weber, K.; Osborn, M.:

Immunochemical detection of actin on fixed and embedded tissues: its potential use in routine pathology.

J. Histochem. Cytochem. 28, 169 (1980)

Bussolati, G.; Gugliotta, :

Nonspecific staining of mast cells by avidin-biotin- peroxidase complexes (ABC).

J. Histochem. Cytochem. 31, 1419-1421 (1983)

Chander, R.; Sainis, K.B.; Lewis, N.F.:

Role of Thymus- Derived Lymphocytes in Aquired Immunity to Salmonellosis in Mice.

Microbiol. Immunol. 30 (12), 1299-1306 (1986)

Cherrington, J.M.; Ghalib, H.W.; Sawyer, M.M.; Osburn, B.J.:

Detection of viral antigens in bluetongue virus- infected ovine tissues, using the peroxidase- antiperoxidase technique.

Am. J. Vet. Res. 46 (11), 2356-2359 (1985)

- Childs, G.; Unabia, G.:
Application of the avidin- biotin- peroxidase complex (ABC) method to the light microscopic localization of pituitary hormones
J. Histochem. Cytochem. 30 (7), 713-716 (1982)
- Cho, N.; Saito- Taki, T.; Nakano, M.:
Delayed hypersensitivity in murine salmonellosis: specificity of footpad reaction in mice infected with rough mutants of Salmonella typhimurium.
Microbiol. Immunol. 27, 167-175 (1983)
- Chu, R.M.; Li, N.J.; Glock, R.D.; Ross, R.F.:
Applications of peroxidase- antiperoxidase staining technique for detection of transmissible gastroenteritis virus in pigs.
Am. J. of Vet. Res. 43 (1), 77-81 (1982)
- Collins, F.M.; Mackaness, G.B.; Blanden, R.V.:
Infection immunity in experimental salmonellosis.
J. Exp. Med. 124, 601-619 (1966)
- Collins, F.M.; Mackaness, G.B.:
Delayed hypersensitivity and Arthus- reactivity in relation to host resistance in Salmonella infected mice.
J. Immunol. 101, 830-845 (1968)
- Collins, F.M.:
Vaccines and cell- mediated immunity.
Bacteriol. Rev. 38, 371-402 (1974)
- Coons, A.H.; Creech, H.J.; Jones, R.N.; Berliner, E.:
The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody.
J. Immunol. 45, 159-170 (1942)
- Curran, R.C.; Gregory, J.:
The unmasking of antigens in paraffin sections of tissue by trypsin.
Experientia 33, 1400 (1977)
- De Lellis, R.A.; Sternberger, L.A.; Mann, R.B.; Banks, P.M.; Nakane, P.K.:
Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology.
Am. J. Clin. Pathol. 71, 483-488 (1979)

- Denk, H.:
Morphologische Nachweismethoden: Methodisches Spektrum (Prinzipien, Mechanismen u. Wertigkeit).
Verh. Dtsch. Ges. Path. 70, 18-27 (1986)
- Desiderio, J.V.; Campbell, S.G.:
Immunization against experimental salmonellosis with liposome-associated O- antigen.
Infect. Immun. 48 (3), 658-663 (1985)
- Ducatelle, R.; Coussement, W.; Hoorens, J.:
Demonstration of Canine Distemper Viral Antigen in Paraffin Sections, using an unlabelled Antibody Enzyme Method.
Am. J. Vet. Res. 41, 1860-1862 (1980)
- Domingo, M.; Ramos, J.A.; Dominguez, L.; Ferrer, L.; Marco, A.:
Demonstration of *Listeria Monocytogenes* with the PAP Technique in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues of Experimentally Infected Mice.
J. Med. Vet. B- Infect. Dis. Immun. 33 (7), 537-542 (1986)
- Ducatelle, R.; Coussement, W.; Hoorens, J.:
Immunoperoxidase study of Aujeszky's disease in pigs.
Res. Vet. Sci. 32, 294-302 (1982)
- Eisen, H.N.; Siskind, G.W.:
Variations in Affinity of Antibodies during the Immune Response.
Biochemistry 3 (7), 996-1008 (1964)
- Eisenstein, T.K.; Sultzer, B.:
Salmonella vaccines: protection by endotoxin protein and lipopolysaccharide in two different mouse strains.
Semin. Infect. Dis. 4, 423-428 (1982)
- Eisenstein, T.K.; Killar, L.M.; Stocker, B.A.D.; Sultzer, B.M.:
Cellular immunity induced by virulent Salmonella in LPS-defective C3H/HeJ mice.
J. Immunol. 133, 958-961 (1984)
- Falini, B.; Taylor, C.R.:
New developments in immunoperoxidase techniques and their application.
Arch. Pathol. Lab. Med. 107, 105-117 (1983)

- Fishleder, A.; Sedmak, D.; Tubbs, R.:
Relative merits of the avidin- biotin complex
(ABC) and unlabeled peroxidase- antiper-
oxidase technics for studying polypeptide
hormones.
Am. J. Clin. Pathol. 77 (6), 770-772 (1982)
- Friedberg, D.; Shilo, M.:
Role of the cell wall structure of Salmonella
in the interaction with phagocytes.
Infect. Immun. 2, 279-285 (1970)
- Galdiero, F.; Benedetto, N.; Quarto, N.; Romano, C.:
Cellular response in S. typhimurium- infected
mice: Evaluation of salmonella receptors of B-
lymphocytes.
Infect. Immun. 21, 349-353 (1978)
- George, A.; Nair, R.; Rath, S.; Ghosh, S.N.; Kamat,
R.S.:
Regulation of cell- mediated immunity in mice
immunised with S. enteritidis.
J. of Med. Microbiology 23 (3), 239-246 (1987)
- Giorno, R.:
A comparison of two immunoperoxidase staining
methods based on the avidin- biotin
interaction.
Diagn. Immunol. 2 (3), 161-166 (1984)
- Graham, R.C.; Lundholm, U.; Karnovsky, M.J.:
Cytochemical demonstration of peroxidase acti-
vity with 3- amino- 9- ethylcarbazole.
J. Histochem. Cytochem. 13, 150-152 (1965)
- Griffith, R.W.; Kramer, T.T.:
Sensitivity of smooth Salmonella cholerae suis
var kunzendorf field strains to antibody com-
plement under various conditions.
Am. J. Vet. Res. 43, 1413-1417 (1982)
- Griffith, R.H.; Kramer, T.T.:
Sensitivity of smooth S. cholerae suis var
kunzendorf to killing by porcine polymorpho-
nuclear neutrophils and its relation to mice
virulence.
Vet. Immunology and Immunopathology 4 (5/6),
593-601 (1983)

- Griffith, R.W.; Kramer, T.T.; Pohlenz, J.F.:
Relationship between the antibody- complement
susceptibility of smooth Salmonella cholerae
suis var kuzendorf strains and their viru-
lence for mice and pigs.
Am. J. Vet. Res. 45 (7), 1342-1348 (1984)
- Guesdon, J.L.; Ternynck, T.; Avrameas, S.:
The use of avidin- biotin interaction in
immunoenzymatic techniques.
J. Histochem. Cytochem. 27, 1131-1139 (1979)
- Haines, D.M.; Cooke, E.M.; Clark, E.G.:
Avidin- Biotin- Peroxidase Complex Immuno-
histochemistry to Detect Immunoglobulin in
Formalin Fixed Skin Biopsies in Canine Auto-
immune Skin Disease.
Can. J. Vet. Res. 51, 104-109 (1987)
- Hall, W.C.; Ward, J.M.:
A comparison of the avidin- biotin peroxidase
complex (ABC) and peroxidase antiperoxidase
(PAP) immunocytochemical techniques for de-
monstrating Sendai virus infection in fixed
tissue specimens.
Lab. Anim. Sci. 34 (3), 261-263 (1984)
- Halverson, C.A.; Falini, B.; Taylor, C.R.; Parker,
J.W.:
Detection of terminal transferase in paraffin
sections with the immunoperoxidase technique.
Am. J. Pathol. 105, 241-254 (1981)
- Hanna, J.; McCracken, R.; O'Brien, J.J.:
Evaluation of a live Salmonella cholerae suis
vaccine by intranasal challenge.
Res. Vet. Sci. 26 (2), 216-219 (1979)
- Haritani, M.; Nakazawa, M.; Oohashi, S.; Yamada, Y.;
Hazirolu, R.; Narita, M.:
Immunoperoxidase evaluation by pneumonic
lesions induced by Pasteurella haemolytica in
calves.
Am. J. Vet. Res. 48 (9), 1358-1362 (1987)
- Heitz, Ph.U.:
Hormonale Tumormarker.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 70, 64-81 (1986)
- Heyderman, E.:
Immunoperoxidase technique in histopathology:
applications, methods, and controls.
J. Clin. Pathol. 32, 971-978 (1979)

- Hormaeche, C.E.:
Natural resistance to *Salmonella typhimurium*
in different inbred mouse strains.
Immunology 37 (2), 311-318 (1979)
- Hormaeche, C.E.; Fahrenkrog, M.C.; Pettifors, R.A.;
Brock, J.:
Acquired immunity to *Salmonella typhimurium* and
delayed (footpad) hypersensitivity in BALB/C
mice.
Immunology 43, 547-554 (1981)
- Hsu, H.S.; Radcliffe, A.S.:
Interactions between macrophages of guinea
pigs and *Salmonellae*: I. Fate of *Salmonella*
typhimurium within macrophages of normal
guinea pigs.
J. Bacteriol. 96, 191-197 (1968)
- Hsu, H.S.; Nakoneczna, J.; Guo, Y.N.:
Histopathological evidence for protective
immunity induced by sonicated *Salmonella*
vaccine.
Can J. Microbiol. 31 (1), 54-61 (1985)
- Hsu, S.M.; Ree, H.J.:
Self-sandwich method: an improved immuno-
peroxidase technique for the detection of
small amounts of antigens.
Am. J. Clin. Pathol. 74, 32-40 (1980)
- Hsu, S.M.; Raine, L.:
Protein A, avidin, and biotin in immunohisto-
chemistry.
J. Histochem. Cytochem. 29 (11), 1349-1353
(1981)
- Hsu, S.M.; Raine, L.; Fanger, H.:
Use of avidin-biotin-peroxidase complex
(ABC) techniques: a comparison between ABC and
unlabeled antibody (PAP) procedures.
J. Histochem. Cytochem. 29, 577-580 (1981)
- Hsu, S.M.; Raine, L.; Fanger, H.:
A comparative study of the peroxidase anti-
peroxidase method and an avidin-biotin-
complex method for studying polypeptide
hormones with radioimmunoassay antibodies.
Am. J. Clin. Pathol. 75, 734-738 (1981)

- Hsu, S.M.; Raine, L.:
The use of a avidin- biotin- peroxidase complex (ABC) in diagnostic and research pathology.
In: Advances in Immunohistochemistry, 31-42,
R.A. De Lellis, Ed., Masson Publishing USA,
Inc., New York, Paris, Barcelona, Milan, Rio
de Janeiro (1984)
- Kenny, K.; Herzberg, M.:
Antibody response and protection induced by
immunization with smooth and rough strains in
experimental Salmonellosis.
J. Bacteriol. 95, 406-417 (1968)
- Killar, L.M.; Eisenstein, T.K.:
Strain dependent variation of delayed- type
hypersensitivity in Salmonella typhimurium
infected mice.
Adv. Exp. Med. Biol. 162, 297-302 (1983)
- Killar, L.M.; Eisenstein, T.K.:
Differences in delayed- type hypersensitivity
responses in various mouse strains in the C3H
lineage infected with Salmonella typhimurium:
strain S1 3235.
J. Immunol. 133, 1190-1196 (1984)
- Killar, L.M.; Eisenstein, T.K.:
Immunity to Salmonella typhimurium infection
in C3H/HeNCr1BR mice: studies with an aroma-
tic- dependent live Salmonella typhimurium
strain as a vaccine.
Infect. Immun. 47, 605-612 (1985)
- Killar, L.M.; Eisenstein, T.K.:
Delayed- type hypersensitivity and immunity to
Salmonella typhimurium.
Infect. Immun. 52 (2), 504-508 (1986)
- Kita, E.; Emoto, M.; Yasni, K.; Katsui, N.; Nishi,
K.; Kashiba, S.:
Cellular aspects of the longer- lasting immu-
nity against mouse typhoid infection afforded
by the live- cell and ribosomal vaccines.
Immunology 57 (3), 431-435 (1986)
- Kramer, T.T.; Pardon, P.; Marly, J.; Bernard, S.:
Conjunctival and intramuscular vaccination of
pigs with a live avirulent strain of Salmo-
nella cholerae- suis.
Am. J. Vet. Res. 48, 1072-1079 (1987)

- Kuusi, N.; Nurminen, H.; Saxen, H.; Valtonen, M.;
Mäkelä, P.H.:
Immunization with major outer membrane proteins in experimental Salmonellosis of mice.
Infect. Immun. 25, 857-862 (1979)
- Kuusi, N.; Nurminen, M.; Saxen, H.; Mäkelä, P.H.:
Immunization with major outer membrane (porin) preparations in experimental Salmonellosis of mice: effect of lipopolysaccharide.
Infect. Immun. 34, 328-332 (1981)
- Lindberg, A.A.; Robertsson, J.A.:
Salmonella typhimurium infection in calves: cell-mediated and humoral immune reactions before and after challenge with live virulent bacteria in calves given live or inactivated vaccines.
Infect Immun. 41 (2), 751-757 (1983)
- Macartney, L.; Macartney, C.M.:
Canine parvovirus: development of immuno-fluorescence and immunoperoxidase.
Res. Vet. Sci. 40 (2), 201-208 (1986)
- Male, D.:
Immunology- An illustrated outline.
Gower Medical Publishing. London, New York (1986)
- Marecki, N.M.; Hsu, H.S.; Mayo, D.R.:
Cellular and humoral aspects of host resistance in murine salmonellosis.
Brit. J. Exp. Pathol. 56, 231-243 (1975)
- Mayr, A.; Eißner, G.; Mayr- Bibrack, B.:
Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin.
Verlag Paul Parey. Berlin, Hamburg (1984)
- McRill, C.M.; Kramer, T.T.; Griffith, R.W.:
Application of the peroxidase- antiperoxidase immunoassay to the identification of salmonella from pure culture and animal tissue.
J. Clin. Microbiol. 20, 281-184 (1984)
- Meador, V.P.; Tabatabai, L.B.; Hagemoser, W.A.:
Identification of Brucella abortus in formalin- fixed, paraffin- embedded tissues of cows, goats, and mice with an avidin- biotin- peroxidase complex immunoenzymatic staining technique.
Am. J. Vet. Res. 47 (10), 2147-2150 (1986)

- Merritt, F.F.; Smith, B.P.; Reina- Guerra, M.; Habasha, F.:
Relationship of cutaneous delayed hypersensitivity to protection from challenge exposure with *Salmonella typhimurium* in calves.
Am. J. Vet. Res. 45 (6), 1081-1085 (1984)
- Mesa- Tejada, R.; Pascal, R.R.; Fenoglio, C.M.:
Immunoperoxidase: A sensitive immunohistochemical technique as a "special stain" in the diagnostic pathology laboratory.
Human Pathol. 8, 313-320 (1977)
- Mitsuyama, M.; Nomoto, K.; Takeya, K.:
Direct correlation between delayed footpad reaction and resistance to local bacterial infection.
Infect. Immun. 36 (1), 72-79 (1982)
- Moore, F.M.; White, S.D.; Carpenter, J.L.; Torchom, E.:
Localization of immunoglobulins and complement by the peroxidase- antiperoxidase method in autoimmune and non- autoimmune canine dermatopathies.
Vet. Immunology and Immunopathology 14 (1), 1-9 (1987)
- Moriarty, G.C.; Moriarty, C.M.; Sternberger, L.A.:
Ultrastructural immunocytochemistry with unlabeled antibodies and the peroxidase- antiperoxidase complex. A technique more sensitive than radioimmunoassay.
J. Histochem Cytochem. 21, 825-833 (1973)
- Nadji, M.; Morales, A.R.:
Immunoperoxidase: Part I. The Technique and its Pitfalls.
Laboratory Medicine 14 (12), 767-771 (1983)
- Nair, R.; Kamat, R.S.:
Effector cell- mediated immune response in mice immunized with *Salmonella*.
J. Med. Microbiol. 15 (2), 215-221 (1982)
- Nakane, P.K.; Pierce, G.B.:
Enzyme labeled antibodies: Preparation and application for localization of antigens.
J. Histochem. Immunochem. 14, 929-938 (1966)

- Nakoneczna, J.; Hsu, H.S.:
The comparative histopathology of primary and
secondary lesions in murine salmonellosis.
Brit. J. Exp. Pathol. 61 (1), 76-84 (1980)
- Palmer, D.G.; Ossent, P.; Suter, M.M.; Ferrari, E.:
Demonstration of rabies viral antigen in
paraffin tissue sections: comparison of the
immunofluorescence technique with the un-
labeled antibody enzyme method.
Am. J. Vet. Res. 46, 283-286 (1985)
- Pearse, A.E.G.:
Histochemistry.
Third Edition 2, Churchill Livingstone, Edin-
burgh and London (1972)
- Petrusz, P.; Ordronneau, P.; Finley, J.C.W.:
Criteria of reliability for light microscopic
immunocytochemical staining.
Histochem. J. 12, 333-348 (1980)
- Pinkus, G.S.; O'Connor, E.M.; Etheridge, C.L;
Corson, J.M.:
Optimal immunoreactivity of keratin proteins
in formalin- fixed, paraffin- embedded tissue
requires preliminary trypsinization.
J. Histochem. Cytochem. 33, 465-473 (1985)
- Plant, H.; Glynn, A.A.; Wilson, B.M.:
Protective effects of a supernatant factor
from Salmonella typhimurium on Salmonella
typhimurium infection of inbred mice.
Infect. Immun. 22, 125-131 (1978)
- Plant, J.E.; Wilson, B.M.; Glynn, A.A.:
The protein- lipopolysaccharide complex ex-
tracted with trichloroacetic acid from Salmo-
nella typhimurium effective in protection of
mice against Salmonella typhimurium infection.
Parasite Immunol. 4 (4), 259-271 (1982)
- Pospischil, A.; Wood, R.L.:
Location of Salmonella typhimurium in swine
tissue by peroxidase antiperoxidase staining
and the electron microscopy.
In IVth International Symposium of Vet. Lab.
Diagnostics. 2.-6.June 1986. Abstracts
Amsterdam, Netherlands , 509-512 (1986)

- Reed, W.M.; Olander, H.J.; Thacker, H.L.:
Studies on the pathogenesis of *S. typhimurium*
and *S. cholerae suis* var *kunzendorf* infection
in weanling pigs.
Am. J. Vet. Res. 47 (1), 75-83 (1986)
- Reynolds, B.L.; Pruul, H.:
Sensitization of complement- resistant smooth
gram- negative bacterial strains.
Infect. Immun. 3, 365-372 (1971)
- Robertsson, J.A.; Svenson, S.B.; Renström, L.H.M.:
Delayed hypersensitivity skin test for de-
tection of immune response against salmonella
in cattle.
Res. Vet. Sci. 32 (2), 225-230 (1982)
- Rogers, D.G.:
Application of the peroxidase- antiperoxidase
technique for the detection of enterotoxigenic
Escherichia coli K99 pilus antigen in
paraffin- embedded tissues.
J. Histochem. Cytochem. 33, 762-766 (1985)
- Rolle, M.; Mayr, A.:
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.
5. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
(1980)
- Rudolph, R.; Weber, A.; Reinacher, M.; Müller, H.-
A.:
Spontane Lungenaspergillose mit "asteroid
bodies" bei Hauskaninchen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschrift 91, 264-
267 (1978)
- Schöll, W.; Grünert, G.:
Suisaloral® "Dessau"- ein Salmonella- chole-
rae- suis- Lebendimpfstoff zur oralen, par-
enteralen und kombinierten Anwendung.
Arch. f. Exp. Vet.med. 34 (1), 91-97 (1980)
- Seifert, G.; Denk, H.; Klein, P.J.; Stein, H.; Otto,
H.F.:
Die Anwendung der Immunocytochemie in der
praktischen Diagnostik des Pathologen.
Der Pathologe 5, 187-199 (1984)

- Short, J.A.; Walker, P.D.:
The location of bacterial antigens on sections of *Bacillus cereus* by the use of soluble peroxidase- antiperoxidase complex and unlabelled antibody.
J. Gen. Microbiol. 89, 93-101 (1975)
- Smith, R.A.; Bigley, N.J.:
Detection of delayed hypersensitivity in mice injected with ribonucleic acid- protein fraction of *Salmonella typhimurium*.
Infect. Immun. 6, 384-389 (1972)
- Smith, R.A.; Esa, A.; Stiff, M.:
Transfer of *Salmonella* resistance and delayed type hypersensitivity with murine- derived transfer factor.
Infect. Immun. 36 (1), 271-276 (1982)
- Sternberger, L.A.:
Some new developments in immunocytochemistry.
Mikroskopie 25, 346-361 (1969)
- Sternberger, L.A.; Hardy, P.H.; Cuculis, J.J.; Meyer, H.G.:
The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparations and properties of soluble antigen- antibody complex (horseradish peroxidase antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes.
J. Histochem. Cytochem. 18, 315-333 (1970)
- Sternberger, L.A.:
Immunocytochemistry.
John Wiley & Sons; New York, Chichester, Brisbane, Toronto (1979)
- Stiglmaier- Herb, M.Th.; Pospischil, A.:
Kryptosporidiose und Toxoplasmose bei Gazellen (*Gazella gazella*).
36. Tagung der Europäischen Gesellschaft für Veterinärpathologie. 8. 9.Juni in Salzburg (1987)
- Stocker, B.A.D.; Hoiseth, S.K.; Smith, B.P.:
Aromatic dependent *Salmonella* spp. as live vaccine in mice and calves.
Dev. Biol. Stand. 53, 47-54 (1983)

Streefkerk, J.K.:

Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with peroxide following methanol.

J. Histochem. Cytochem. 20, 829-831 (1972)

Svenson, S.B.; Nurminen, M.; Lindberg, A.A.:

Artificial Salmonella vaccines: O- antigenic oligosaccharide- protein induce protection against infection with Salmonella typhimurium. Infect. Immun. 25, 863-872 (1979)

Svenson, S.B.; Lindberg, A.A.:

Artificial Salmonella vaccines: Salmonella typhimurium O- antigen specific oligo-saccharide- protein conjugates elicit protective antibodies in rabbits and mice. Infect. Immun. 32, 490-496 (1981)

Taylor, C.R.:

Immunoperoxidase techniques.

Arch. Pathol. Lab. Med. 102, 113-121 (1978)

Tharp, M.D.; Seelig, L.L.; Tigelaar, R.E.; Bergstresser, P.R.:

Conjugated Avidin Binds to Mastcell Granules.

J. Histochem. Cytochem. 33 (1), 27-32 (1985)

Tizard, J.R.:

Einführung in die Veterinärmedizinische Immunologie.

Verlag Paul Parey, Berlin u. Hamburg. (1981)

Turfrey, B.A.:

The use of immuno- peroxidase for the identification of Moraxella bovis in tissue sections.

Br. Vet. J. 141, 195-196 (1985)

Udhayakumar, V.; Muthukkaruppan, V.R.:

Characteristics of live vaccines in relation to delayed type- hypersensitivity and protective immunity in murine experimental salmonellosis.

Immunol. Lett. 6, 299-302 (1983)

Udhayakumar, V.; Muthukkaruppan, V.R.:

Protective immunity induced by Outer membrane proteins of Salmonella typhimurium in mice.

Infect. Immun. 53 (3), 816-821 (1987)

- Udhayakumar, V.; Muthukkaruppan, V.R.:
An Outer membrane protein (Porin) as an eliciting antigen for delayed- type hypersensitivity in murine salmonellosis.
Infect. Immun. 55 (3), 822-824 (1987)
- Valtonen, M.V.:
Role of phagocytosis in mouse virulence of Salmonella typhimurium recombinants with O-antigen 6,7 or 4,12.
Infect. Immun. 18, 574-582 (1977)
- Vandeveldel, M.; Hugli, E.; Isler, A.:
Histological immunoenzyme techniques in canine tissues: evaluation of various methods and modifications.
Res. Vet. Sci. 34, 193-198 (1983)
- Van Furth, R.; Cohn, Z.A.; Hirsch, J.G.; Humphrey, J.H.; Spector, W.G.; Langevoort, H.L.:
The Mononuclear Phagocyte System: A New Classification of Macrophages, Monocytes, and their Precursor Cells.
Bull. Wld. Hlth. Org. 46, 845-852 (1972)
- Wells, P.S.; Hsu, H.S.:
Interactions between Macrophages of Guinea Pigs and Salmonellae. II. Phagocytosis of Salmonella typhimurium by Macrophages of Normal Guinea Pigs.
Infect. Immun. 2, 145-149 (1970)
- Wood, G.S.; Warnke, R.:
Suppression of endogenous avidin- binding activity in tissues and its relevance to biotin- avidin detection systems.
J. Histochem. Cytochem. 29, 1196-1203 (1981)
- Woodland, R.M.; El-Sheick, H.; Darougar, S.:
Sensitivity of immunoperoxidase and immunofluorescence staining for detecting chlamydia in conjunctival scrapings and in cell culture.
J. Clin. Pathol. 31, 1073-1077 (1978)

Herrn Prof. Dr. J. von Sandersleben danke ich herzlich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes sowie für die guten Arbeitsbedingungen am Institut.

Herrn Prof. Dr. A. Pospischil möchte ich besonders für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Korrektur der Arbeit und die Unterstützung bei ihrer Erstellung danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. R. Wanke für seine immer freundliche und hilfsbereite Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen und der Auswertung der Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. W. Hermanns danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Frau E. Kemper möchte ich herzlich für die Einführung in die immunhistochemischen Arbeitsmethoden danken.

Gedankt sei auch all den Kollegen beider Lehrstühle des Institutes für Tierpathologie, die mir durch wertvolle Anregungen und Hinweise geholfen haben.

Zu guter Letzt möchte ich ganz besonders herzlich meiner Frau danken, die durch ihre stete Ermutigung, vor allem aber durch ihre große Hilfe bei der Anfertigung des Manuskriptes sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

LEBENS LAUF

Thomas- Dietrich Hein Ewringmann	geb. am 30. Mai 1960 in München
Eltern	Hein Ewringmann, Offizier Ruth Ewringmann, geb. Hebert
Ehefrau	Pia Ewringmann, geb. Lerchl, Tierärztin
gemeinsames Kind	Niklas Ewringmann, geb. 9. 6. 1987
1966-1968	Grundschule in Ettlingen/ Baden
1968-1970	Gemeinschaftsschule Köln/ Brück
1970-1971	Gymnasium Köln- Holweide
1971-1979	Staatl. Gymnasium Pullach
Juni 1979	Abitur
1979-1981	Studium der Landwirtschaft an der TU München- Weihenstephan
1981-1986	Studium der Tiermedizin an der LMU München
Juli 1986	Approbation als Tierarzt
November 1986 - - Februar 1988	vollbeschäftigte wissenschaft- liche Hilfskraft am Insti- tut für Tierpathologie der LMU München
seit Februar 1988	wissenschaftlicher Angestell- ter an der Landesanstalt für Wasserforschung, Ver- suchsanlage Wielenbach

